



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÉNERO  
*LEPTOSPIRA* EM COLEÇÕES DE ÁGUA DOCE NO DISTRITO DE  
LEIRIA**

**ADRIANA MANUELA SARDIÑA ALDEIA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**JANEIRO, 2016**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÉNERO  
*LEPTOSPIRA* EM COLEÇÕES DE ÁGUA DOCE NO DISTRITO DE  
LEIRIA**

**ADRIANA MANUELA SARDIÑA ALDEIA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**Orientadora:** Doutora Maria Luísa Jorge Vieira, Investigadora Auxiliar da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica (Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL).

**JANEIRO, 2016**

Parte dos resultados incluídos na presente dissertação foram publicados no livro de resumos do 3º Congresso Nacional de Medicina Tropical e 1º Congresso Lusófono de Doenças transmitidas por vetores, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa (UNL), que teve lugar em Lisboa, no referido Instituto, 20 e 21 de abril de 2015:

**Adriana Aldeia**, Teresa Carreira, Maria Luísa Vieira. 2015. Identificação molecular de bactérias do género *Leptospira* em coleções de água doce no Distrito de Leiria.

Disponível na pag.32, in:

[http://congressomedtrop2015.admeus.net/uploads/congressomedtrop2015/editor/Livro% 20de% 20Resumos.pdf](http://congressomedtrop2015.admeus.net/uploads/congressomedtrop2015/editor/Livro%20de%20Resumos.pdf)

e ainda apresentados numa comunicação em Poster no Congresso Microbiotec'15:

Teresa Carreira, **Adriana Aldeia**, Mónica Nunes, Maria Luísa Vieira. Molecular identification of *Leptospira* spp found in freshwater collections at the Leiria district, Portugal. Congresso de Microbiologia e Biotecnologia (Microbiotec 2015), Universidade de Évora, 10 a 12 dezembro 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

A realização deste Mestrado era um objetivo na minha vida, um objetivo cercado por muitas barreiras que dificultavam o seu alcance; desde estar fora do meu país de origem, estar fora da minha cidade de residência em Portugal, estar longe da minha família, privada do apoio familiar direto, por me ter que sacrificar economicamente, entre outros motivos. Muitas vezes pensei em não me candidatar para este Mestrado, escolher um mais acessível ou simplesmente não fazer nenhum, mas se a minha decisão tivesse sido esperar o momento justo para não ter que me sacrificar para realizar o curso, talvez nunca o tivesse feito; pois todos os acontecimentos importantes nas nossas vidas, requerem sacrifício e esforço.

Devo agradecer a muitas pessoas que de longe ou de perto me deram força e ajuda, mas, antes de tudo respiro de tranquilidade e satisfação, e agradeço a mim própria por tudo, por estes dois anos de luta e de aprendizagem, pela minha paciência e constância, pela minha força e dedicação, e pela vontade que tinha de fazer este Mestrado, e por ter escolhido o Instituto como Instituição de Ensino pós-graduado.

Agradeço à Direção Geral de Ensino Superior (DGES) por me ter concedido uma bolsa de alojamento e acção social, que apesar de ter sido muito difícil de conseguir, sem esta ajuda não teria sido possível frequentar o Mestrado.

Agradeço aos meus pais, em especial a minha mãe pelo amor infinito e por representar um apoio e ajuda constante e presente, muitas vezes sem perceber a complexidade deste curso, mas, sempre esteve ao meu lado. Agradeço a minha tia Laurinda me ajudou economicamente e por acreditar e confiar em mim.

Agradeço ao Laboratório de Análises Clínicas Susana Rosas, Lda., que me acolhe profissionalmente, mas, em especial à Diretora Técnica do mesmo, Dra. Cristina Cruz, que tornou possível a minha transferência para a sede do laboratório em Lisboa, onde trabalhei durante os dois anos do Mestrado.

Agradeço aos meus amigos Gil Lopes, Carlos Matos, Filipe Rocha, Tânia Lisboa, Cátia Gaspar, Caty, Maria Alejandra, Tiago Lagos, ao meu irmão Diamantino e a minha cunhada Maria Elvira, por me darem força, alegria, amor e muita coragem.

Não estou minimamente arrependida por ter escolhido o Mestrado de Microbiologia Médica do IHMT, UNL, graças a essa decisão, tive a sorte de receber conhecimentos de cada um dos meus professores, todos magníficos; por eles o meu sonho de algum dia ser professora, aumentou. Sinto e sempre sentirei um grande respeito por eles e alguma saudade das suas aulas.

Estou agradecida principalmente a duas professoras que no meu critério, foram mais além de tudo; a Professora Doutora Isabel Couto da Unidade Curricular de Tuberculose e Micobactérias Atípicas, que não estando ligada ao meu trabalho de investigação foi sempre muito carinhosa e afetuosa, aparte de ser uma excelente professora; e a professora (Investigadora) Doutora Maria Luísa Vieira, minha orientadora, por ser tão dedicada e preocupada e sobretudo por confiar em mim e ajudar-me tanto, pela sua simpatia e seriedade e pelos seus conhecimentos na sua área, quase infinitos. Ambas as professoras foram responsáveis por fazerem aumentar em mim a paixão pela minha profissão, que sinceramente estava diminuída. Agora mais do que nunca acredito que a Microbiologia é a ciência mais linda, porque nos permite conhecer quase intimamente o nosso mundo, duma maneira diferente das restantes pessoas.

Sinto-me especialmente agradecida à Técnica Superior e Mestre Teresa Carreira do Grupo de Leptospiriose e Borreliose de Lyme, da Unidade de Microbiologia Médica, por me acompanhar sempre no trabalho de bancada no laboratório, pela sua alegria constante (nunca a vi chateada ou de mau humor) e a Mestre Mónica Nunes por estar também presente e por me ajudar sempre que foi preciso.

Agradeço a toda a Unidade de Microbiologia Médica do IHMT, UNL, por contar com pessoas tão competentes.

Finalmente, agradeço a vida porque apesar de ser dura, é linda, e nos permite realizar os nossos sonhos.

Infinitamente agradecida.

## RESUMO

A Leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por espiroquetas patogénicas do género *Leptospira*, cujos reservatórios principais são os roedores, mas também outros mamíferos (suínos e bovinos), que podem excretar leptospiros pela urina durante meses ou anos. Estas bactérias podem sobreviver na água durante muito tempo, tornando-se esta um meio de transmissão de grande importância, destas bactérias. A população humana em contacto com água contaminada fica assim exposta a um elevado risco de infeção.

O objetivo desta investigação foi detetar/identificar molecularmente bactérias do género *Leptospira* presentes em coleções de água doce no Distrito de Leiria (Portugal), e avaliar o risco de Leptospirose, face ao contacto da população com estas águas.

Analysaram-se 100 amostras de água, obtidas em 15 locais no referido distrito (rios, fontes, fontanários, lagoas). Utilizaram-se três protocolos de PCR para deteção de DNA leptospírico: i) uma *nested*-PCR com *primers* universais designados (A e B), obtidos do gene *rrs* (16S) para espiroquetas do género *Leptospira*; ii) uma segunda PCR (nas amostras positivas na primeira abordagem), usando *primers* (G1 e G2), desenhados no gene *secY*, presente em algumas espécies patogénicas de *Leptospira*; e iii) uma outra *nested*-PCR, com *primers* obtidos do gene *lipL32* codificante da proteína de superfície com o mesmo nome, comum a todas as leptospiros patogénicas. Foram sequenciados alguns dos produtos amplificados, e os resultados foram analisados por BLAST quanto à similaridade com sequências depositadas no *GenBank* para as espécies de *Leptospira*.

Foi detetado DNA de *Leptospira* spp., em 41 amostras, das quais 28 (68,3%) corresponderam a leptospiros patogénicas, tendo a maioria revelado uma elevada similaridade (98 - 99%) com a espécie *Leptospira interrogans*.

Os resultados obtidos mostraram a presença inequívoca de leptospiros patogénicas nas coleções de água doce na região de Leiria, estabelecendo um alerta para as Autoridades de Saúde locais, no sentido da intervenção na melhoria da qualidade da água de modo a prevenir-se o risco de Leptospirose.

## ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis of worldwide distribution caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*, whose main reservoir are rodents, but also other mammals (swine and bovines), which can shed leptospires through urine for months or years. These bacteria can survive in water for a long time, being therefore an important vehicle of *Leptospira* transmission to humans. So, the human population in contact with contaminated water is exposed to a high risk of infection.

The purpose of this research is to identify the molecular level bacteria of *Leptospira* genus, present in freshwater collections in the Leiria's district (Portugal), and to evaluate the risk of leptospirosis, due to the contact of population with such waters.

A total of 100 samples of freshwater collected from 15 locations previously selected, in that district (rivers, fountains, drinking fountains, ponds) was analyzed. Three PCR protocols for *Leptospira* DNA detection were used: *i*) a nested-PCR with universal primers (A and B), obtained from *rrs* (16S) gene for *Leptospira* genus; *ii*) a second PCR using primers (G1 and G2), drawn on *secY* gene present in some pathogenic *Leptospira* species; and *iii*) another nested-PCR targeting *lipL32* gene, that encoding the surface protein with the same name, common to all pathogenic leptospires. Some of amplified products were sequenced and the results analyzed by BLAST, regarding to the similarity with sequences deposited in GenBank to *Leptospira* species.

*Leptospira* spp., DNA was detected in 41 samples of which 28 (68.3%) matching to pathogenic leptospires, and the majority revealed a high similarity (98-99%) with *Leptospira interrogans* species.

The obtained results showed an unequivocal presence of pathogenic leptospires in freshwater collections at the Leiria region, establishing an alert to the local Health Authorities, towards intervention in the improvement of water quality in order to prevent the risk of Leptospirosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac – Anticorpo

Ag – Antigénio

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

C – Citosina

CID – Coagulação intravascular disseminada

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DGS – Direção Geral de Saúde

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (=ADN - Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – Desoxirribonucleótido fosfatado

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMJH – *Ellinghausen, McCullough & Johnson and Harris*

IgG – Imunoglobulina do tipo G

IgM – Imunoglobulina do tipo M

IHMT/UNL – Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa

IL - Interleucina

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

LipL32 – Lipoproteína Lepto32

LPS – Lipopolissacárido

MACRO – Técnica de Aglutinação Macroscópica

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µm – Micrómetro

µM - Micromolar

mg - Miligrama

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

min – Minuto

ml – Mililitro

NH<sub>4</sub> – Amónia

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sulfato de Amónia

OMP – *Outer Membrane Protein* (=Proteína da membrana externa)



OmpA – *Outer membrane protein A*  
OmpL1 – *Outer Membrane Leptospira protein 1*  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
P – p value (nível de significância)  
pb – Par de Bases  
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (=Reação em cadeia da polimerase)  
pH – Potencial de hidrogénio  
rpm – rotação por minuto  
rRNA – Ribosomal *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico ribossomal)  
s.l. – Sensu lato  
s.s. – Sensu stricto  
TAM – Teste de Aglutinação Microscópica  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral-alfa  
U - Unidade  
V – Volt  
 $\chi^2$  – Qui-quadrado  
% – Percentagem  
°C – Grau Celsius

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE QUADROS .....	xiv

## 1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificação do tema .....	2
1.2. Objetivos .....	4
1.3. Revisão da literatura: A Leptospirose e o agente etiológico.....	5
1.3.1. Dados históricos .....	5
1.3.2. Espiroquetas do género <i>Leptospira</i> (Morfologia, Biologia e Classificação) .....	6
1.3.3. Epidemiologia .....	9
1.3.4. Situação atual da Leptospirose.....	11
- Leptospirose no mundo .....	11
- Leptospirose em Portugal.....	11
1.3.5. Patogénese e manifestações clínicas.....	12
- Leptospirose Anictérica.....	14
- Leptospirose Ictérica .....	14
1.3.6. Diagnóstico laboratorial.....	14
1.3.6.1. Métodos Diretos .....	15
- Exame microscópico em campo escuro.....	15
- Cultura e isolamento.....	16
- Amplificação de DNA leptospírico (PCR).....	17
1.3.6.2. Métodos Indiretos .....	19
- Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACRO).....	20
- Técnica ELISA .....	20
- Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) .....	21

1.3.7. Tratamento, controlo e prevenção .....	22
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
2.1 Área de estudo .....	25
2.1.1. Locais de amostragem.....	26
2.2. Coleção de amostras .....	27
2.2.1. Determinação (local) de parâmetros físicos e químicos das amostras .....	28
2.2.1.1. Medição de pH e Nitritos .....	29
2.3. Observação microscópica de amostras .....	30
2.4. Purificação das amostras .....	31
2.4.1. Centrifugação .....	32
2.4.2. Filtração .....	33
2.5. Extração de DNA das amostras .....	33
2.5.1. Extração através de fervura a 96°C .....	34
2.5.2. Extração através de kit comercial .....	34
2.6. Amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp .....	34
2.6.1. Testes de sensibilidade e especificidade dos <i>primers</i> .....	34
2.6.2. Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> universais .....	36
2.6.3. Amplificação de DNA leptospírico com <i>primers</i> específicos .....	37
2.7. Sequenciação de DNA de <i>Leptospira</i> spp. das amostras .....	40
2.8. Análise e tratamento de dados .....	40
<b>3. RESULTADOS</b>	
3.1. Coleção e caracterização das amostras .....	42
3.1.1. Valor de pH e quantificação de Nitritos .....	42
3.1.2. Tipologia da água .....	43
3.2. Resultados da observação microscópica das amostras .....	44
3.3. Dados da purificação das amostras .....	44
3.3.1. Após a centrifugação e filtração .....	44
3.4. DNA extraído das amostras de água .....	44
3.5. DNA amplificado de <i>Leptospira</i> spp. ....	45

3.5.1. Determinação da especificidade e sensibilidade de <i>primers</i> universais e específicos .....	45
3.5.2. DNA leptospírico nas amostras, usando <i>primers</i> universais.....	48
3.5.3. DNA leptospírico nas amostras, usando <i>primers</i> específicos (G1-G2 e lipL32) .....	49
3.6. Sequenciação de DNA de <i>Leptospira</i> spp. das amostras. ....	51
3.7. Tratamento estatístico.....	52
<b>4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>6. ANEXOS</b>	
Anexo 1 – Documentação fotográficas da recolha de amostras de água, nos diferentes locais selecionados.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Microfotografia de <i>Leptospira</i> spp.....	7
<b>Figura 1.2</b>	Aspeto de dois tubos com meio de cultura semissólido e seletivo para <i>Leptospira</i> spp.....	8
<b>Figura 1.3</b>	Representação esquemática do ciclo de transmissão das leptospiros.....	10
<b>Figura 1.4</b>	Imagem de microscopia de fundo escuro.....	16
<b>Figura 2.1</b>	Representação gráfica do Distrito de Leiria e dos concelhos que o constituem.....	25
<b>Figura 2.2</b>	Representação de alguns pontos de amostragem.....	26
<b>Figura 2.3</b>	Contentor de urina e mala térmica.....	28
<b>Figura 2.4</b>	Resumo esquemático dos parâmetros observados e registados durante a colheita das amostras de água.....	29
<b>Figura 2.5</b>	Representação das tiras indicadoras de pH e respectivo padrão colorimétrico.....	30
<b>Figura 2.6</b>	Representação das tiras do teste para determinação e quantificação de nitritos.....	30
<b>Figura 2.7</b>	Microscópio de fundo escuro.....	31
<b>Figura 2.8</b>	Microcentrífuga “Spectro fuge 16M” marca <i>Labonet</i> .....	32
<b>Figura 2.9</b>	Representação de material utilizado para realização da filtração das amostras de água.....	33
<b>Figura 2.10</b>	Representação dos dois conjuntos de <i>primers</i> universais (A e B) utilizados na reacção de <i>nested</i> -PCR na amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp., nas amostras de água e previamente ensaiados no teste de especificidade.....	36
<b>Figura 2.11</b>	Termociclador <i>MyCycler</i> ( <i>BioRad</i> <sup>®</sup> ).....	37
<b>Figura 2.12</b>	<i>Primers</i> lipL32 utilizados na amplificação de DNA de leptospiros patogénicas.....	39
<b>Figura 3.1</b>	Representação gráfica da percentagem de amostras com pH 5, 6 e 7.....	43

<b>Figura 3.2</b>	Representação gráfica da percentagem de amostras colhidas em água corrente e estagnada.....	43
<b>Figura 3.3</b>	Representação de resultados obtidos na técnica de <i>nested</i> -PCR ( <i>primers</i> A e B) com DNA extraído através de kit comercial e fervura a 96°C .....	45
<b>Figura 3.4</b>	Fotos de géis que representam a especificidade dos protocolos de PCR utilizados.....	46
<b>Figura 3.5</b>	Foto do gel que representa a sensibilidade da técnica <i>nested</i> -PCR ( <i>primers</i> A e B).....	47
<b>Figura 3.6</b>	Foto do gel representando a sensibilidade da técnica <i>nested</i> -PCR ( <i>primers</i> lipL32).....	47
<b>Figura 3.7</b>	Foto do gel que representa a sensibilidade da técnica de PCR ( <i>primers</i> G1-G2).....	48
<b>Figura 3.8</b>	Foto do gel que representa resultados de amplificação de DNA leptospírico ( <i>primers</i> A e B) .....	48
<b>Figura 3.9</b>	Foto do gel que representa os resultados de amplificação de DNA leptospírico ( <i>primers</i> G1-G2).....	50
<b>Figura 3.10</b>	Foto do gel que representa os resultados de amplificação de DNA leptospírico ( <i>primers</i> lipL32) .....	50

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1.1</b>	Testes laboratoriais para o diagnóstico de Leptospirose de acordo com os dias de evolução da doença e o produto biológico a analisar.....	15
<b>Quadro 2.1</b>	Locais de amostragem com a respectiva codificação, coordenadas geográficas e concelho ao qual pertencem .....	27
<b>Quadro 2.2</b>	Condições necessárias para amplificação de DNA leptospírico (1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> reação) do protocolo <i>nested</i> -PCR com os <i>primers</i> universais A e B.....	37
<b>Quadro 2.3</b>	<i>Primers</i> G1 e G2 utilizados para a amplificação de algumas espécies patogénicas de <i>Leptospira</i> .....	38
<b>Quadro 2.4</b>	Resumo das condições para amplificação de DNA leptospírico através da utilização dos <i>primers</i> (G1 e G2).....	38
<b>Quadro 2.5</b>	Resumo das condições para a 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> amplificação de DNA leptospírico através da utilização dos <i>primers</i> lipL32.....	40
<b>Quadro 3.1</b>	Locais de amostragem e número de amostras colhidas em cada um deles .....	42
<b>Quadro 3.2</b>	Amostras de água com resultados microscópicos.....	44
<b>Quadro 3.3</b>	Valores da sensibilidade dos diferentes protocolos de PCR.....	46
<b>Quadro 3.4</b>	Amostras com resultados microscópicos positivos e os resultados obtidos na <i>nested</i> -PCR (A e B).....	49
<b>Quadro 3.5</b>	Resultados obtidos nos diferentes protocolos de PCR aplicados nas amostras de água.....	51
<b>Quadro 3.6</b>	Resultados da sequenciação das amostras.....	52

# **1. INTRODUÇÃO**



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Justificação do Tema

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, considerada uma doença emergente, endêmica em muitos países, principalmente em países tropicais, podendo o clima e as condições sociais e profissionais favorecerem a sua prevalência (Calderon *et al.*, 2014). A doença é causada por espiroquetas do género *Leptospira*, o qual é, na classificação convencional, constituído por espécies do complexo *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.) e *Leptospira biflexa* (s.l.), patogénicas e saprófitas, respetivamente. As primeiras, causam doença nos humanos e em outras espécies animais, e as segundas, saprófitas, que agrupam as leptospirosas de vida livre que se encontram em águas superficiais e raramente estão associadas a infeções em mamíferos. A leptospirose é considerada uma doença infecciosa com um amplo polimorfismo clínico, o que dificulta muitas vezes um diagnóstico correto, tornando-se indispensável a utilização de recursos laboratoriais para a confirmação do mesmo.

Algumas espécies de animais, nomeadamente, os roedores, atuam como reservatórios/hospedeiros principais, indispensáveis para a persistência dos focos de infeção, pelo que os humanos são simplesmente hospedeiros acidentais, sendo pouco eficientes para a manutenção das leptospirosas. A presença de leptospirosas é assim, muito comum nos roedores, razão pela qual são considerados os seus principais reservatórios, podendo as mesmas infetar mamíferos como, canídeos, bovinos, suínos, equinos, entre outros, sendo os rins de todos estes animais, incluindo os dos humanos, os órgãos preferenciais destas espiroquetas (Vanasco *et al.*, 1998, Trueba *et al.*, 2002).

Após a sua dispersão no ambiente, as leptospirosas são muito dependentes da água para sobreviverem e alcançar o(s) seu(s) hospedeiro(s), sendo esta um ‘veículo’ preferencial para a respetiva transmissão e consequente infeção dos referidos (potenciais) hospedeiros que com ela contactem. Assim, quer o solo húmido e/ou águas contaminadas com a urina dos animais infetados constituem frequentes fontes de infeção. A infeção humana por *Leptospira* spp., ocorre assim, quando as leptospirosas patogénicas atingem a corrente sanguínea após um contacto direto com urina contaminada de animais (reservatórios) e/ou hospedeiros acidentais, ou indiretamente

através do contacto com águas ou solos contaminados. É por este motivo que a leptospirose é considerada uma doença profissional/ocupacional, afetando principalmente agricultores, pescadores em coleções de água doce, veterinários, trabalhadores de matadouros, de saneamento básico (recolha de lixo), operários da construção civil e militares, entre outras profissões. Importa ainda referir, que o risco de infeção inclui também pessoas que praticam desportos com grande exposição e contacto prolongado com água, como por exemplo, canoagem, natação ou qualquer outra atividade de recreio praticada em água doce, como rios, lagos/lagoas e barragens.

Não obstante a gravidade que esta doença pode assumir, constituindo mesmo um problema de Saúde Pública, verifica-se, que muitas vezes é subdiagnosticada e até subnotificada, sendo a prevenção da mesma, um fator de particular importância. Porém, o pôr em prática essa prevenção nem sempre é fácil, já que a existência de rios, afluentes, lagoas, fontanários e outras coleções de água contaminados com estas bactérias, permite que as pessoas em contacto com as mesmas possam contrair infeção. Por outro lado, também é comum a existência destas coleções de água em muitas regiões de Portugal, aumentando assim a probabilidade de exposição e consequente infeção por leptospiras. Assim, uma maneira de contribuir para a prevenção da doença é saber qual ou quais os serovares (serovar é o táxon base) de *Leptospira* spp. e em que proporção estas bactérias estão presentes nas nossas coleções de água doce.

## 1.2. Objetivos

Pelas razões anteriormente expostas, decidiu-se investigar a presença de *Leptospira* spp., em diversas amostras de águas de superfície (rios e afluentes, lagos, lagoas e também fontanários) em diferentes locais do Distrito de Leiria, com posterior identificação molecular das referidas espiroquetas.

Para concretizar o plano de investigação proposto foram traçados objetivos, sendo o objetivo geral o seguinte:

- Conhecer e identificar através de técnicas moleculares a presença de *Leptospira* spp., em coleções de água doce do distrito de Leiria, algumas das quais de livre e fácil acesso pela população humana em atividades de recreio e lazer (ex. lagos, barragens,...) numa perspectiva de prevenção da leptospirose enquanto doença emergente e com impacto na Saúde Pública.

Para a concretização deste objetivo, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- Colher amostras de água de lagos, fontes, poços, bebedouros e de outras origens;
- Pesquisar leptospiros por observação direta em microscopia de fundo escuro nas amostras de água coletada;
- Pesquisar e identificar *Leptospira* spp., em amostras de água de diferentes origens, através de técnicas moleculares: Reação da Polimerase em Cadeia [*Polymerase Chain Reaction*, (PCR)], convencional e *nested*, com *primers* universais para o Género *Leptospira* e específicos para *L. interrogans*, seguida de sequenciação e análise da mesma.

### **1.3. Revisão da literatura: A Leptospirose e o agente etiológico**

#### **1.3.1. Dados históricos**

Em 1850, Adolf Weil, vinha observando e estudando uma doença caracterizada por causar icterícia e hemorragias. Esta doença adotou o nome de “*tifo bilioso*”, que em duas ocasiões afetou quatro dos seus pacientes. As manifestações clínicas desta doença englobavam icterícia severa, febre e hemorragias, e em algumas ocasiões comprometimento renal (Gomes, 2013).

Em 1881, em Praga, foi também estudada por outro médico, o Dr. Weiss, uma doença caracterizada por causar icterícia e hemorragias, denominada, na altura, como “*icterus catarrhalis*”. Posteriormente, entre 1882-1886 e depois destes estudos, A. Weil realizou então a primeira descrição da doença, que nos anos seguintes viria a ser conhecida como “Doença de Weil” e que seria classificada como uma afecção de tipo ocupacional, por nessa altura, todos os afetados serem trabalhadores de esgotos (Vijayachari *et al.*, 2008; WHO, 2003).

Nos anos seguintes foram realizadas, por diferentes investigadores, descrições de doenças com sinais e sintomas semelhantes aos descritos por A. Weil, como o caso da “*Schlamfieberepidemie*” descrita por F. Muller em 1890, ou a “*Feldfieber*” descrita por Rimpau e colaboradores, que representava então o que hoje se conhece por leptospirose não ictérica. Todos estes factos indicam que a leptospirose estava presente em diversas partes do mundo, era até investigada por diferentes pessoas que, porém, apesar de descreverem os mesmos sintomas, lhe atribuíam diferentes designações (Gomes, 2013).

Em 1907, Stimson demonstrou o que tinha sido descrito por A. Weil no passado, isto é, a existência duma doença que provocava hemorragias com envolvimento renal, conseguindo observar a partir duma amostra proveniente dos túbulos renais de um doente, microrganismos aglomerados em forma de espiral e com extremidades em forma de gancho, dando-lhe o nome de “*Spirochaeta interrogans*”, pela semelhança que tinham com um ponto de interrogação (Faine *et al.*, 1999).

Stimson concluiu que a doença responsável pela morte do paciente de onde havia sido extraída a amostra foi a febre-amarela e não a doença de Weil, o que posteriormente, seria descrito como um erro por parte do investigador. No entanto, embora o

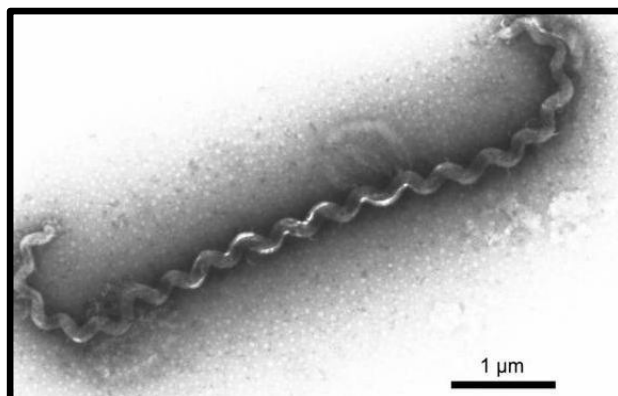
diagnóstico estivesse errado, os resultados eram fidedignos, criando-se, então, quase de forma accidental, as bases da nomenclatura da doença de Weil, tal como hoje se conhece. (Faine *et al.*, 1999; Vieira, 2006).

Todos os resultados obtidos na era pré-Stimson, em diferentes partes do mundo, foram de grande importância e demonstraram, indiretamente, a existência duma doença de distribuição mundial, muitas vezes mortal e com um padrão de sinais e sintomas característicos. No entanto, foi em 1915 que se deu um outro acontecimento histórico e relevante na Doença de Weil, Inada e Ido, médicos japoneses, demonstraram a etiologia da leptospirose quando realizaram estudos num grupo de militares que manifestavam sintomas da Doença de Weil, ao isolarem espiroquetas a partir de um cobaio infetado com sangue de um doente militar que padecia da infeção (Vijayachari *et al.*, 2008).

À semelhança das investigações realizadas anteriormente, o agente causal adotou um nome correspondente às manifestações clínicas que os doentes apresentavam. A terminologia escolhida foi assim a de “*Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica*”(Kobayashi, 2001; Dutta, 2005).

### **1.3.2. Espiroquetas do Género *Leptospira* (Morfologia, Biologia Classificação)**

As leptospiros são bactérias com morfologia helicoidal pertencentes à família *Leptospiraceae* de reduzidas dimensões, com 6 a 20 µm de comprimento e um diâmetro de 0,1 a 0,2 µm. Apresentam extremidades em forma de gancho (Figura 1.1.), são muito móveis, devido à presença de dois flagelos (um em cada extremidade), e exibem movimentos rápidos de rotação e de *spin* (movimento em saca-rolhas), sobretudo nas extremidades encurvadas, mantendo-se a parte central mais ou menos fixa. Possuem uma parede celular típica das bactérias de Gram negativo, mas com a camada de peptidoglicano aderente à membrana citoplasmática interna e sobreposta pela membrana externa. Nesta última, os lipopolissacáridos (LPS's) e proteínas, constituem os principais componentes antigénicos de superfície. A membrana externa é estrutural e imunologicamente semelhante à das outras bactérias de Gram negativo, sendo no entanto, os LPS menos tóxicos nas leptospiros (Bharti *et al.*, 2003).



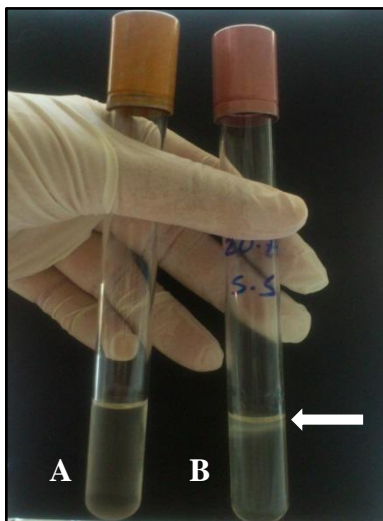
**Figura 1.1.** Microfotografia de *Leptospira* spp.  
[Adaptado de Carreira, 2009)]

As bactérias do género *Leptospira* são aeróbias, com uma temperatura ótima de multiplicação entre 28-30°C e pH 7,2 a 7,4. Podem atravessar filtros com membranas de 0,2 μm de diâmetro. A cultura e isolamento destas bactérias são demorados e difíceis, tendo um tempo de geração de quatro (4) a cinco (5) horas para os serovares saprófitos e de oito (8) a 12 horas para os serovares patogénicos. Crescem em meios enriquecidos com ácidos gordos de cadeia longa como fonte de carbono, e vitaminas B1 e B12, ferro e iões de amónia, sendo o crescimento bacteriano, demonstrado por observação através de microscopia de campo escuro. Os meios de cultura tornam-se seletivos pela adição de inibidores do crescimento de microrganismos oportunistas, como o 5-fluorouracilo e de vários antimicrobianos, como o sulfato de Neomicina, a Polimixina B, Rinfampicina e Vancomicina (Gomes, 2013).

O meio seletivo mais utilizado para o crescimento e/ou manutenção de leptospiros *in vitro* é o meio de Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH) ao qual é ainda adicionada albumina bovina a 1% e Tween 80, como fonte de ácidos gordos de cadeia longa. Entre as formulações de meios líquidos e semissólidos que contém soro de coelho podem ser também utilizados, em alternativa, apesar do sucesso ser inferior, o meio de Korthof e o de Fletcher (Bharti *et al*, 2003).

Como referido, o crescimento das leptospiros é lento no isolamento inicial, devendo as culturas ser mantidas durante pelo menos 13 semanas antes de eliminá-las, dado que alguns serovares e/ou estirpes têm crescimento mesmo muito lento, obrigando, por isso, a um tempo de incubação mais prolongado, podendo chegar aos cinco a seis meses de

incubação. Esta deve ser realizada sob agitação permanente e à temperatura de 29°C (Vieira, 2006).



**Figura 1.2.** Aspeto de dois tubos com meio de cultura semissólido e seletivo para *Leptospira* spp.. **A** - meio sem inóculo; **B** – observa-se a formação do **anel de Dinger** (seta), traduzindo a existência de crescimento das leptospiros

O crescimento no meio semissólido atinge a maior concentração numa zona próxima da superfície do meio, que se torna cada vez mais turva à medida que o tempo de incubação se prolonga e a multiplicação das bactérias ocorre. Este crescimento está relacionado com a tensão de oxigénio ideal. A zona correspondente ao crescimento das leptospiros é designada por anel de Dinger ou disco, como se documenta na (Figura 1.2.) (Vieira, 2006; Gomes, 2013).

Na natureza, as leptospiros sobrevivem na água ou no solo lamacento, com pH levemente alcalino e, na ausência de radiação ultravioleta, podem manter-se viáveis até cerca de seis meses. Por outro lado, estas bactérias são pouco resistentes, e facilmente destruídas pela desidratação provocada por uma temperatura elevada ( $\geq 35^{\circ}\text{C}$ ). Aliás, temperaturas entre os 50-60°C destroem-nas, completamente, em pouco tempo. Por sua vez, a resistência aos desinfetantes químicos não é grande e são muito sensíveis a valores de pH ácido pelo que são destruídas pelo suco gástrico em 30 minutos quando, por exemplo, são ingeridas através de água contaminada.

Convencionalmente, todas as leptospiros patogénicas estão classificadas dentro do complexo *Leptospira interrogans* (s.l.), que inclui 23 serogrupos conhecidos com

aproximadamente 260 serovares, e as leptospirosas saprófitas, pertencentes ao complexo *Leptospira biflexa* (s.l.), com cerca de 65 serovares, por sua vez agrupados em 38 serogrupos. Ambas as espécies pertencem à Família *Leptospiraceae* e à Ordem *Spirochaetales* (Levett, 2001; Gomez, 2008).

No entanto, do ponto de vista molecular o gênero *Leptospira* de acordo com Wang *et al.* (2015), inclui atualmente 21 espécies distribuídas em três grupos: patogénicas (9 espécies), intermediárias [seis (6) espécies] e saprófitas [seis (6) espécies]. No primeiro grupo as mais importantes são: *L. interrogans* sensu stricto (s.s.), *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri*; no segundo: *L. inadai*, *L. broomii* e *L. fainei* e no terceiro: *L. biflexa* (s.s.), *L. wolbachii* e *L. kmetyi*, entre outras.

### 1.3.3. Epidemiologia

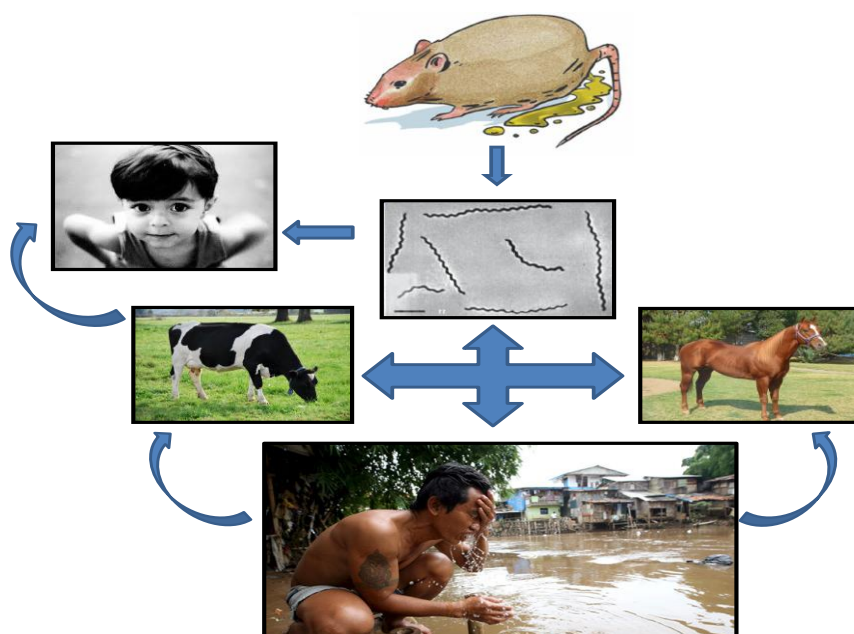
Como referido anteriormente a leptospirose é uma zoonose amplamente disseminada no mundo. O principal animal reservatório é o rato, pois é capaz de eliminar o microorganismo pela urina durante toda a vida, constituindo-se como um portador renal crónico. Isto faz com que a leptospirose não tenha limites geográficos, estando, distribuída a nível global. As taxas de incidência, no entanto, são mais significativas em países, ou regiões de clima tropical, comparativamente com as regiões de clima temperado. O agente infetante é assim transmitido de um mamífero infetado para outro(s), incluindo os humanos, através do contacto direto ou indireto com urina contendo leptospirosas viáveis, ou os próprios animais infetados, ou ainda através do solo, água ou até utensílios contaminados (Faine *et al.*, 1999; Lomar *et al.*, 2005).

A prevalência da doença é, assim, favorecida pelas condições ambientais das regiões de clima tropical e subtropical, onde a temperatura elevada e os altos índices pluviométricos em determinados períodos do ano, dão origem a cheias (inundações) que favorecem o aparecimento de surtos epidémicos.

Além da transmissão indireta através do ambiente, ao qual estão particularmente expostos os pescadores (de água doce), as lavadeiras, os trabalhadores de saneamento básico (esgotos e/ou recolha de lixo), e aqueles que se dedicam à agricultura em campos



alagados ou irrigados (ex. arrozais), importa igualmente considerar o contacto direto, que pode ocorrer pela manipulação de animais ou dos seus tecidos infetados, e à qual estão especialmente expostos os veterinários, alguns profissionais de laboratório e aqueles que se ocupam da ordenha de gado. A transmissão pessoa a pessoa é excecional, mas pode ocorrer pelo contacto com a urina (na fase de leptospiúria) de um enfermo (Linz *et al.*, 1986). Por outro lado, os animais de estimação mais comuns, como cães e gatos, podem também transmitir o agente infeccioso às pessoas que mantenham contacto direto com eles. Basta para isso que os ratos estejam presentes no ambiente, isto é, nos espaços onde normalmente estes animais circulam (Lomar *et al.*, 2005), como documentado na Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Representação esquemática do ciclo de transmissão das leptospiros.  
(Grafismo criado e montado pela autora)

Além disso, a ausência de saneamento básico também proporciona uma fonte de infecção muito elevada para os humanos, principalmente nas zonas rurais (Crespo, 1990).

Na generalidade dos países, esta zoonose é de difícil diagnóstico devido, sobretudo, à variabilidade dos quadros clínicos muitas vezes sobreponíveis a muitas outras doenças infecciosas causadas por outros agentes etiológicos, o que obriga a dispor de laboratórios

adequados, metodologias muito específicas e pessoal muito treinado para a execução das mesmas. Todas estas limitações condicionam o conhecimento correto da distribuição da Leptospirose no mundo, pelo que se acredita que a doença está atualmente muito subestimada (Gonçalves, 2009; Salwani *et al.*, 2014),

#### **1.3.4. Situação atual da Leptospirose**

##### ➤ Leptospirose no mundo

Sendo uma doença de distribuição mundial e tendo em conta a existência de países ainda em desenvolvimento, esta doença tem uma prevalência aproximada entre 500.000 e 1.000.000 de casos registados de Leptospirose humana por ano (Picardeau *et al.*, 2008).

A incidência da Leptospirose é bastante variável, dependendo de diferentes variáveis, como as condições sanitárias e outras; mas estima-se que o valor de incidência pode situar-se entre 10 e 100 casos por 100 000 habitantes; considerando-se uma epidemia quando os casos aumentam acima de 100 no mesmo número de habitantes (Hartskeerl *et al.*, 2011).

##### ➤ Leptospirose em Portugal

Em Portugal a leptospirose foi desconhecida até 1931. Só nesse ano, em Lisboa, e por Luís Figueira, foi identificado e descrito o primeiro caso da doença. Posteriormente, nos anos 40 do século passado, através da realização de estudos de carácter epidemiológico, ficou a saber-se um pouco mais da distribuição da doença no país, devido sobretudo, aos trabalhos do Professor Fraga de Azevedo, um ilustre investigador do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Estes estudos seriam retomados, mais tarde, nos anos 80, pela Investigadora Margarida Collares Pereira, com a realização de diversos inquéritos epidemiológicos que mostraram que a maioria dos casos provinha da zona centro do país e das ilhas; principalmente do Arquipélago do Açores (ilhas de São Miguel e Terceira). Em 1950, devido ao aumento do número de casos, a leptospirose, foi

considerada como Doença de Declaração Obrigatória (DDO) para *Leptospira icterohaemorrhagiae*, tendo em 1987, a referida declaração passado a incluir todas as estirpes infetantes (Vieira, 2006).

No período de 1993-2003 foi referido, que a taxa de incidência da doença no Arquipélago dos Açores era de 11,1 casos por 100.000 habitantes/ano, valor dez vezes superior à incidência da doença em Portugal continental (Vieira *et al.*, 2006). Atualmente, e desde 1993, a Região Autónoma dos Açores é considerada como a principal área endémica do país, a qual tem constituído um problema de Saúde Pública que não deve ser descurado (Collares-Pereira *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2010).

#### **1.3.5. Patogénese e manifestações clínicas**

Como já referido, as bactérias do género *Leptospira* podem ser transmitidas de forma direta ou indireta, pelo contato com urina de roedores ou animais infetados, ou pelo contacto com água ou solos contaminados com leptospiros, respetivamente. Devido às dimensões reduzidas destas espiroquetas, a infeção pode ocorrer por penetração na pele, esteja ou não lesionada; incluindo também as mucosas, nasofaríngea, bucal, genital ou conjuntival. Alguns estudos têm demonstrado a existência de casos onde a transmissão sexual ou placentária esteve presente e a infeção por ingestão de água contaminada é possível, embora não seja muito comum. No entanto, a infeção por leptospiros é favorecida não só pela dimensão das mesmas, como também pelas suas características que lhes permitem penetrar no organismo do hospedeiro; elas possuem propriedades como a motilidade e a própria ação de toxinas, que permitem uma sobrevivência mais prolongada dentro do hospedeiro, principalmente em órgãos pelos quais manifestam tropismo, como é o caso dos rins (Gomez, 2008; Gomes, 2013).

Por outro lado, os mecanismos pelos quais as bactérias do género *Leptospira* spp., danificam ou destroem os tecidos, continuam ainda pouco conhecidos; embora tenha já sido descrita a capacidade de adesão a células epiteliais *in vitro*.

Logo que a bactéria entra no hospedeiro pelos mecanismos já descritos, começa a fase de leptospiremia, onde o microrganismo migra na corrente sanguínea, tentando evitar a sua destruição pela acção do sistema imune do hospedeiro, incluindo a acção do complemento, capacidade considerada como um mecanismo de virulência que, à semelhança de outros agentes infecciosos, ainda não foi completamente esclarecida (Gomez, 2008; Gomes, 2013).

No hospedeiro, o sistema de imunidade humoral e celular atua como mecanismo de defesa principal após a entrada da bactéria, destruindo as mais suscetíveis a este mecanismo. Instalada a bacteriemia e dependendo do hospedeiro, inicia-se o período de incubação por lapsos de tempo prolongados, chegando a alcançar os 30 dias, com uma multiplicação rápida em hospedeiros mais suscetíveis, mas que vai depender do serovar da leptospira infetante, sendo mais rápida nas leptospirosas mais virulentas. Mas, regra geral, o tempo de geração situa-se entre as oito e as 16 horas (Gomes, 2013).

Cada hospedeiro reage de maneira diferente face aos danos causados pelas leptospirosas. Estes danos refletem-se geralmente nos vasos sanguíneos, podendo causar lesões e alterações muito graves, como a necrose tubular renal, lesão hepato-pulmonar, meningite, miosite e, na grávida, placentite, chegando a desenvolver, nalgumas ocasiões, coagulação intravascular disseminada, pela ativação em cascata do complemento; levando a uma infeção fulminante, já que é ativado todo o mecanismo da coagulação de maneira inapropriada, originando hemorragias muito severas. (Ferreira *et al.*, 2010; Gomes, 2013). A leptospirose é conhecida por causar complicações ao nível renal, mas num hospedeiro suscetível qualquer órgão pode ser afetado na fase aguda da infeção.

As manifestações clínicas da leptospirose, não se limitam só à icterícia e hemorragias. A doença pode manifestar-se de duas formas: anictérica e icterica incluindo assim um amplo e variado grupo de sinais e sintomas que podem variar de inaparentes a graves.

Em 2007, Zunino e colaboradores, num estudo de atualização, à época, sobre leptospirose na América Latina, sinalizaram os sintomas mais frequentes da leptospirose de maneira decrescente: febre (100%), mialgias intensas (71-92%), cefaleias (85-99%), manifestações gastrointestinais (17,2-62,3%) e síndrome meníngeo (19,4%-22,7%).

➤ Leptospirose Anictérica

Esta constitui a forma mais benigna e comum da doença, representando entre 80 a 90% dos casos. Durante a infeção aguda por leptospirose anictérica, o hospedeiro revela uma sintomatologia caracterizada principalmente por arrepios e mal-estar geral, incluindo febre, mialgias e outros (Zunino, 2007).

➤ Leptospirose Ictérica

Tipicamente chamada “Doença de Weil”, é a forma mais grave da leptospirose, caracterizada principalmente pela presença de icterícia no doente infetado. As manifestações clínicas não só incluem os sintomas descritos anteriormente como podem chegar a causar falência multiorgânica; e é nesta forma de leptospirose que o doente pode chegar a desenvolver uma coagulação intravascular disseminada, miocardite, insuficiência renal aguda e choque (Bhart *et al.*, 2003; Segura *et al.*, 2005; Splicher *et al.*, 2005), a que correspondem taxas de mortalidade entre 5-15% entre os infetados. Em última instância, a doença instala-se de modo prolongado, ou agudo e progressivo, sendo geralmente, fatal.

### **1.3.6. Diagnóstico Laboratorial**

Por apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas e epidemiológicas, o diagnóstico clínico da Leptospirose, não é suficiente; pelo que deve ser sempre confirmado e comprovado laboratorialmente.

O diagnóstico laboratorial abarca uma série de testes onde a escolha e utilização dos mesmos vai depender do material biológico a analisar, do tempo de evolução da doença após os primeiros sintomas e da disponibilidade dos testes no laboratório. Por esta razão existem dois tipos de métodos de diagnóstico: métodos diretos e métodos indiretos. O métodos diretos permitem a identificação de leptospiros através da cultura ou deteção de DNA leptospírico mediante análise molecular, e os métodos indiretos ou de rastreio, permitem detetar anticorpos anti – *L. interrogans* presentes na amostra do doente.

No quadro 1.1. indica-se o método e o(s) teste(s) a utilizar para o diagnóstico da Leptospirose, dependendo da amostra biológica disponível e dos dias de evolução da doença.

**Quadro 1.1.** Testes laboratoriais para o diagnóstico de Leptospirose de acordo com os dias de evolução da doença e o produto biológico a analisar (*adaptado de Vieira, 2006*).

Métodos	Dias de Evolução	Produto Biológico	Teste
MÉTODOS DIRETOS	≤ 10 dias	Sangue, LCR	Exame microscópico direto (em fundo escuro)
		Sangue	Cultura em meio seletivo semissólido (ex. EMJH)
		Sangue, Urina, LCR, humor aquoso	PCR (amplificação de DNA específico)
	>10 dias	Urina	Exame microscópico direto (em fundo escuro)
		Urina	Cultura em meio seletivo semissólido (ex. EMJH)
MÉTODOS INDIRETOS (SEROLOGIA)	(Rastreio) ≥ 5 dias	Soro, LCR	Teste de Aglutinação macroscópica (com Ag. polivalente inactivado)
	(Confirmação) >6 dias	Soro, LCR	ELISA (detecção Acs IgM)
		Soro, LCR	Teste de Aglutinação Microscópica (usando antígenos vivos)

Acs – anticorpos; Ag – antígeno

### 1.3.6.1. Métodos Diretos

#### ➤ Exame Microscópico em campo escuro

A utilização desta técnica está limitada a profissionais com experiência na observação da forma morfológica da bactéria, em microscópio de campo (fundo) escuro, sendo este o único meio que permite a observação das espiroquetas.

A confiabilidade dos resultados não depende só da qualidade da amostra e capacidade do observador, é preciso que a mesma contenha uma concentração superior a  $10^4$  leptospiras/ml, podendo, assim, identificar-se a morfologia, estrutura, forma e movimentos característicos do microrganismo (Figura 1.4.) (Levett, 2001; Carreira, 2009; Gonçalves, 2009).



**Figura 1.4.** Imagem de microscopia de fundo escuro

(Adaptado de <http://www.austincc.edu/microbio/2704x/li.htm>)

#### ➤ Cultura e Isolamento

Dentro das técnicas pertencentes aos métodos diretos, a cultura e isolamento é a única que permite dar um diagnóstico definitivo de Leptospirose. Por ter a bacteriemia início nos primeiros dias da doença, o sangue é considerado a amostra mais apropriada para a cultura, sempre que seja utilizada antes da antibioticoterapia. É importante destacar que aproximadamente dez dias após o começo dos sintomas, as leptospiras estão presentes na urina, podendo recorrer-se a urocultura para o diagnóstico da infecção. No entanto, neste caso, a probabilidade de obter cultura positiva a partir da urina é muito mais baixa, comparado com a hemocultura, devido à eliminação de formas não viáveis ou eliminação inconstante.

Ao contrário de outras bactérias, a cultura de leptospiras, exige muita dedicação e tempo, sendo imprescindível a utilização de um meio de cultura especializado para

conseguir o seu isolamento. Independentemente do tipo de amostra, a cultura deve ser realizada em um meio semissólido como o EMJH, descrito anteriormente, incubada entre os 28°C e 30°C e agitação constante. As culturas devem ser visualizadas em microscópio de campo escuro a cada 15 dias, durante aproximadamente quatro meses, tempo requerido para o descarte das mesmas (Barragam, 2011).

Por último, a utilidade da cultura não se limita só ao diagnóstico de Leptospirose a partir de amostras humanas ou animais, pode ser utilizada na vigilância ativa da doença no ambiente, tal é o caso de desastres naturais como inundações, ou simplesmente controlo epidemiológico durante os diferentes períodos do ano (Vanasco, 1998), sendo aplicado o método de cultura semelhante ao já descrito, com utilização do meio EMJH semissólido e incubação por 30 dias a 29° -30°C (Salwani, 2014).

#### ➤ Amplificação de DNA leptospírico (PCR)

A técnica de *Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)* foi descrita por Katy B. Mullis em 1985, mas foi a partir dos anos 90 que a utilização de técnicas moleculares cresceu exponencialmente, sendo aplicadas cada vez mais no diagnóstico direto de infeções causadas por microrganismos, como as bactérias de género *Leptospira*, onde o isolamento das mesmas, a partir da cultura, requer períodos prolongados de tempo, tornando-se esta técnica pouco viável na rotina laboratorial. A PCR apesar de ser algo dispendiosa em termos de reagentes, tem a vantagem de oferecer resultados rápidos, sendo útil no diagnóstico precoce da doença (Ferreira *et al.*, 2010).

Tecnicamente e no âmbito do diagnóstico da Leptospirose, o fundamento da PCR sustenta-se na amplificação exponencial de quantidades mínimas de uma sequência específica de DNA leptospírico, permitindo assim a síntese de produto detectável. Para a realização desta técnica existe uma gama muito ampla de amostras, que incluem material clínico, amostras biológicas animais e humanas como sangue, urina, tecidos e órgãos, amostras ambientais como água e outros, que podem ser utilizadas diretamente ou depois duma purificação e extração do DNA, sendo a última a mais habitual. (Ferreira *et al.*, 2010).



Para a realização da técnica de PCR, existem diferentes protocolos com uma variedade de sequências iniciadoras (*primers*) que se ligam por complementaridade ao início da sequência de DNA que se quer amplificar e que aumentam ou não a especificidade do PCR. Há *primers* que permitem identificar só o género *Leptospira*, devido às sequências iniciadores mostrarem afinidade por fragmentos de DNA ligados ao gene *rrs* codificante da subunidade ribossomal 16S (16SrNa) presente em todas as espécies de leptospiros (Meiren,1995). Por outro lado, com a utilização de oligonucleótidos específicos para amplificação de um fragmento do gene *secY*, é possível detectar DNA de algumas espécies de leptospiros patogénicas (Gravekmp,1993), sendo ainda possível com base noutros genes alvo, como o *lipL32*, amplificar DNA leptospírico, dado que o referido gene está presente em todas as espécies de *Leptospira* patogénicas.

Desde a criação da técnica, têm sido descritas várias modificações, sendo importante referir:

- **Multiplex PCR:** nesta modalidade podem ser detetados vários agentes infecciosos na mesma reação, devido à utilização de várias sequências iniciadoras complementares a diferentes moléculas de DNA-alvo.
- **Nested PCR:** a sensibilidade desta modalidade é muito alta; isto deve-se ao facto de as amostras serem submetidas a duas amplificações utilizando dois pares de *primers*, em que a segunda amplificação é realizada a partir do produto da primeira, no entanto, por esta razão é uma técnica muito suscetível a contaminações.
- **PCR em tempo real:** atualmente esta técnica tem sido muito utilizada na deteção de DNA, porque ao contrário das outras reações de PCR, na PCR em tempo real, a amplificação é visualizada à medida que a reação ocorre, sendo também um método quantitativo (Ferreira *et al.*, 2010).

Regra geral, as técnicas moleculares não só são eficazes na rapidez dos resultados, como permitem também emitir um diagnóstico antecipado antes da produção de anticorpos detetáveis pelos métodos indiretos.

Num estudo realizado por Marta Cardona e colaboradores, em 2008, publicado na Revista da Sociedade Venezuelana de Microbiologia, foi mostrado que a PCR realizada a partir de amostras de urina, tem mais sensibilidade do que aquela realizada a partir de amostras de soro; sabendo que em amostras de urina a cultura e isolamento muitas vezes não é possível, esta seria uma vantagem da técnica molecular, que destaca a sua importância no diagnóstico da leptospirose.

No entanto, a PCR não é utilizada no diagnóstico de rotina da leptospirose, pois nem todos os laboratórios estão capacitados tecnicamente para a realização de testes moleculares, nem conseguem suportar os custos que implica o desenvolvimento destas técnicas. E, por outro lado, as amostras a analisar devem conter uma concentração mínima de leptospiros que permita a amplificação de DNA. Esta técnica só permite identificar a patogenicidade ou não dos microrganismos, não podendo detetar o serovar da estirpe infetante, sendo esta numa desvantagem devido à grande importância deste dado a nível epidemiológico (Carreira, 2009).

Por último, e da mesma maneira que a cultura, a PCR não se limita à deteção de *DNA* leptospírico a partir de amostras humanas ou animais. Também tem uma importância significativa no âmbito da investigação e diagnóstico precoce da leptospirose, chegando a superar a cultura e o isolamento, pela rapidez com que são emitidos os resultados e a confiabilidade dos mesmos.

#### **1.3.6.2. Métodos Indiretos**

Os testes incluídos nos métodos indiretos, disponíveis nos laboratórios de referência, estão baseados principalmente em exames serológicos, capazes de detetar a existência de anticorpos anti-*L. interrogans*, não sendo úteis no início da doença, devido à ausência destes, nesse período (Carreira, 2009).

Dentro dos testes incluídos nos métodos indiretos destacam-se: a Técnica de Aglutinação Macroscópica, Técnica *ELISA* e Técnica de Aglutinação Microscópica (TAM) adotada como técnica de referência, pela OMS (WHO/LS, 2003)

➤ Técnica de Aglutinação Macroscópica (MACRO)

Baseada numa reação de aglutinação antígeno-anticorpo, também conhecida como MACROLepto, utiliza uma lâmina onde a amostra a analisar, que neste caso é soro, é homogeneizado com um antígeno inativado constituído por uma ou vários serovares/estirpes isoladas, preferencialmente na região ou país onde se utiliza o teste. Regra geral, este teste é utilizado como técnica de rastreio da Leptospirose, mas devido à rapidez na obtenção de resultados e ao baixo custo de aquisição e reprodutibilidade, muitas vezes é utilizado principalmente em regiões endémicas e de poucos recursos como técnica de diagnóstico (Vieira, 2006; Carreira, 2009).

O resultado do teste é facilmente evidenciado por uma aglutinação macroscópica, materializada em segundos, sendo isto uma vantagem por não precisar de pessoal técnico especializado para a execução e interpretação da técnica (Vieira, 2006; Carreira, 2009).

➤ Técnica ELISA

O teste imunoenzimático (*ELISA*) é considerado também como um teste de rastreio para o diagnóstico da Leptospirose. É um teste acessível, sensível e de fácil realização, que pode também oferecer uma resposta rápida, mas tal como a Aglutinação Macroscópica, precisa da aplicação da técnica de referência para a confirmação do resultado (Maïtes *et al.*, 2004).

Esta técnica serve para a quantificação tanto de antígenos como anticorpos, utilizando diferentes reações enzimáticas como fosfatase e peroxidase. A valorização de anticorpos específicos vai depender do antígeno que se utilize, produzindo-se assim uma reação antígeno-anticorpo (Ferreira *et al.*, 2010).

Em relação ao diagnóstico da Leptospirose a partir desta técnica, é útil, tanto na fase aguda como numa fase mais tardia, permitindo estimar a quantidade de anticorpos IgM e IgG anti-*Leptospira*. Para a realização do teste, é utilizado uma placa de

microaglutinação revestida com antígeno leptospírico, onde é colocado o soro a estudar, com uma lavagem e incubação posterior. Uma reação inicial antígeno-anticorpo é evidenciada pela utilização de um conjugado marcado com uma enzima e substrato cromogénico e no fim da reacção o resultado é revelado pela obtenção duma solução de cor que é medida num espectrofotómetro, onde a intensidade é proporcional à quantidade de anticorpos presentes (Vieira, 2006; Carreira, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Gomes, 2013).

A sensibilidade deste teste imunoenzimático é geralmente satisfatória e superior à observada pela técnica de referência (TAM), no entanto, esta última possui maior especificidade, devido à capacidade que tem na identificação do serovar infetante, o que não é conseguido pelo teste *ELISA* (Levett *et al.*, 2001)

No âmbito da veterinária, o uso deste ensaio é complicado, em zonas do mundo em que a vacinação é comum, pois alguns animais vacinados desenvolvem títulos tanto para IgM como para IgG, produzindo resultados positivos e confusos (Gomes, 2013).

#### ➤ Teste de Aglutinação Microscópica (TAM)

Dentro dos já descritos testes serológicos, a técnica de referência ou “*Gold Standard*” para o diagnóstico da Leptospirose é a “Técnica de Aglutinação Microscópica”, também conhecida como TAM. O fundamento deste teste inclui também uma reação antígeno-anticorpo com seroaglutinação microscópica, onde é utilizada uma bateria de antígenos vivos que inclui geralmente 24 serovares de leptospiros patogénicas (*L. interrogans* s.l.) e um serovar representante de *L. biflexa* s.l. (saprófita).

A sensibilidade e especificidade da TAM são elevadas, entre 92% e 95% respectivamente (Carreira, 2009), mas para a realização da técnica é preciso pelo menos duas amostras distintas: uma colhida na fase aguda da infeção e outra na fase tardia da mesma, após cerca de duas semanas, o que permite acompanhar a cinética de anticorpos específicos, o que ajuda no diagnóstico da doença.

Esta técnica permite identificar o serogrupo da estirpe infetante, o que é muito importante do ponto de vista epidemiológico, dado que na maior parte das vezes permite conhecer as principais leptospiros circulantes numa determinada região ou país. No entanto, esta técnica obriga a dispor duma bateria constituída por culturas vivas de leptospiros, cuja manutenção é bastante exigente, a par da necessidade de recursos específicos (técnicos e humanos) para a realização da mesma. Acresce ainda a subjetividade da leitura e interpretação dos resultados e ainda a necessidade de obter, pelo menos, duas amostras séricas consecutivas para a confirmação do serogrupo presuntivo da estirpe infetante. Todas estas limitações implicam que a utilização da técnica na rotina laboratorial não seja comum, estando disponível apenas em laboratórios de referência.

### **1.3.7. Tratamento, controlo e prevenção**

No tratamento desta doença, um bom diagnóstico e terapia adequada aplicada precocemente são aspetos muito importantes.

Na leptospirose é imprescindível o uso de antibióticos para o tratamento e prevenção. Em estudos realizados em *hamsters* a utilização de antibióticos esteve relacionada com a diminuição substancial de antígenos de *Leptospira* spp. Por outro lado, estudos clínicos demonstraram que a terapia com antibióticos é útil tanto na fase inicial como tardia da doença, destacando-se assim a importância da utilização de antibióticos no tratamento da Leptospirose. As recomendações da Organização Mundial da Saúde para o tratamento da infeção em 2003, incluem penicilina endovenosa (1.500.000 U cada seis horas), ceftriaxone (1g uma vez ao dia) ou cefotaxime (1g cada seis horas) para a forma grave, mantida por sete dias. Para as formas menos severas da doença onde não exista comprometimento de órgãos pode aplicar-se tratamento via oral, com antibióticos como amoxicilina, ampicilina, eritromicina ou azitromicina; sendo utilizada a doxicilina no tratamento profilático da doença em humanos. Durante a terapia, as toxinas libertadas devido à lise das bactérias pelo antibiótico podem induzir a libertação de citocinas, causando febre e hipotensão, síndrome conhecido como Jarish-Herxheimer (JH); mas o

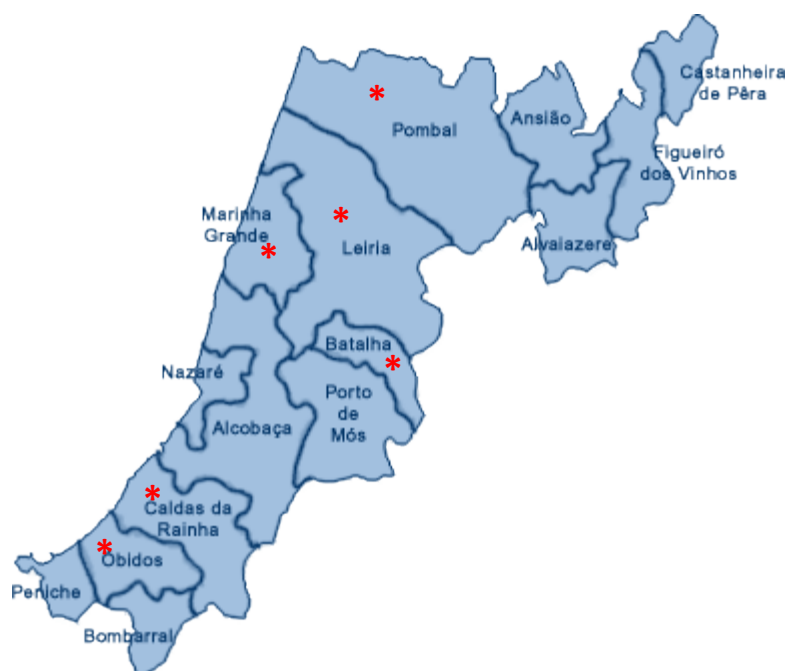
seu surgimento não contraindica a aplicação da antibioterapia (Daher, 2010; Zunino *et al.*, 2007).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

Para a realização do presente trabalho, escolheu-se o Distrito de Leiria como área de estudo, o qual é constituído por diversos concelhos (Figura 2.1.). Decidiu-se trabalhar neste Distrito por vários motivos: o primeiro, por ser uma região com uma grande diversidade de coleções de água doce, onde o contacto das pessoas com os mesmos é habitual, através de diferentes atividades, como agricultura, atividades de lazer, ecoturismo e outras; existindo uma elevada probabilidade de aquisição da infeção com as leptospiros caso, estas estejam presentes, nas referidas águas. Outra razão foi a localização das coleções, sempre próximas de zonas residenciais ou pertencentes a parques turísticos.



**Figura 2.1.** Representação gráfica do Distrito de Leiria e dos concelhos que o constituem. Estão assinalados com (\*) os concelhos onde se realizaram colheitas de amostras.

(Adaptado de <http://aep.org.pt/publicacoes/estudos-de-mercado-regionais/leiria>)



É de referir que em muitas destas coleções de água doce, desembocam esgotos de origem agrícola e urbana, provenientes de Leiria (sede de concelho e capital de Distrito), onde em períodos do ano com muita pluviosidade os níveis de água aumentam exponencialmente. A par disto, importa considerar a proximidade das zonas residenciais e a possível presença de bactérias do género *Leptospira*, tudo isto, no seu conjunto pode contribuir para um potencial risco de infeção e a consequente presença de casos de Leptospirose.

Por último, e mais a título pessoal, houve a preocupação de contribuir e impulsionar ou expandir a investigação no âmbito da Leptospirose, a outra região de Portugal e, no caso, a um Distrito considerado mais de província, e por consequência mais distante daqueles onde se situam as principais cidades do país, e que, por isso têm sido mais estudadas.

#### **2.1.1. Locais de Amostragem**

Como referido, a área de estudo foi o distrito de Leiria, onde com base nas características das coleções de água doce, tais como o tipo de água, localização, fauna presente nas proximidades (espaços envolventes), entre outros aspetos, se escolheram diferentes locais de amostragem distribuídos aleatoriamente em seis concelhos do Distrito: Leiria, Pombal, Marinha Grande, Batalha, Caldas da Rainha e Óbidos. Estes locais de amostragem incluíram: lagoas, rios e fontanários (Figura 2.2.).



**Figura 2.2.** Representação de alguns pontos de amostragem (*Foto original da autora*).

Foram estudados 15 locais de amostragem (Quadro 2.1.), aos quais se atribuiu uma letra de identificação, para facilitar o registo das amostras e posteriormente, os respetivos resultados.

**Quadro 2.1.** Locais de amostragem com a respetiva codificação, coordenadas geográficas e concelho ao qual pertencem.

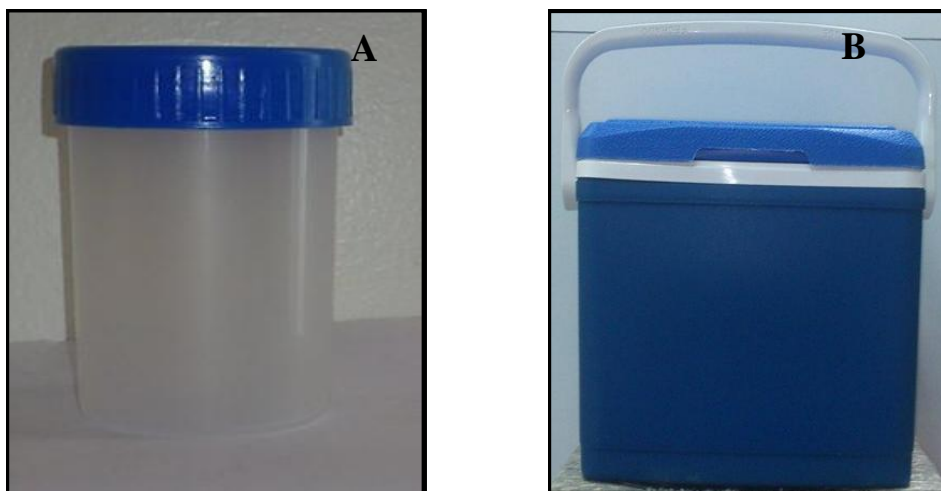
Cod.	Local de amostragem	Coordenadas	Concelho
A	Fonte das Três Bicas	39° 44' 34" N 8° 48' 20" W	Leiria
B	Fonte do Jardim Luís de Camões	39° 44' 40.8'' N 8° 48' 23.3'' W	Leiria
C	Fonte Luminosa	39° 44' 37" N 8° 48' 25" W	Leiria
D	Rio Lis	39° 52' N 08° 58' W	Leiria
E	Rio Lis (Cortes)	39° 41' 5" N 8° 46' 8" W	Leiria
F	Ecoparque sensorial Pia do Urso	39° 35' 52.92" N 8° 43' 0.11" W	Batalha
G	Mata de São Pedro de Moel	39° 45' 19" N 9° 1' 56" W	Marinha Grande
H	Lagoa de Óbidos	39° 25' N 9° 13' W	Caldas da Rainha e Óbidos
I	Antigo lavadouro de Leiria	39° 44' 45" N 8° 48' 12" W	Leiria
J	Fonte Joaquim Ferreira	39° 42' 02" N 8° 47' 25" W	Leiria
K	Fonte junto da Paróquia	39° 42' 02" N 8° 47' 25" W	Leiria
L	Fonte do Jardim Sto. Agostinho	39° 74' 164" N 8.80254 W	Leiria
M	Parque Municipal Marinha Grande	39° 45' 6.37" N 8° 55' 50.39" W	Marinha Grande
N	Lagoa da Ervedeira	39° 55' 46" N 8° 53' 45" W	Leiria
O	Lagoa Vermoil	39° 51' 3.14" N, 8° 39' 8.26" W	Pombal

## 2.2. Coleção de Amostras

O período de coleção de amostras incluiu os meses de outubro de 2014 a fevereiro 2015; as amostras foram colhidas nas margens (rio, lagoas, fontes e fontanários).

A técnica de amostragem utilizada neste trabalho foi semelhante à descrita previamente por outros autores (Benacer *et al.*, 2013; Salwani, 2014), mas com algumas modificações introduzidas por nós, nomeadamente: *i)* por uma questão de ordem prática/logística foram utilizados para a colheita de amostras contentores esterilizados, do tipo dos de colheita de urina (Figura 2.3. A); *ii)* a quantidade de amostra (água) foi de aproximadamente 100 ml, colhida, como descrito, da margem e da superfície da

afluente (coleção), tanto em água estagnada como corrente, com uma profundidade não superior a dez centímetros, devido à natureza aeróbia das leptospiros.



**Figura 2.3.** **A** - Exemplo de contentor esterilizado. **B** - Mala térmica, utilizada para o transporte das amostras de água (*Fotografia original da autora*).

O transporte e armazenamento das amostras foram sempre realizados com suporte de frio (Figura 2.3. B), e a análise das mesmas foi iniciada num período de tempo não superior a 72 horas após a colheita (Benacer, 2012).

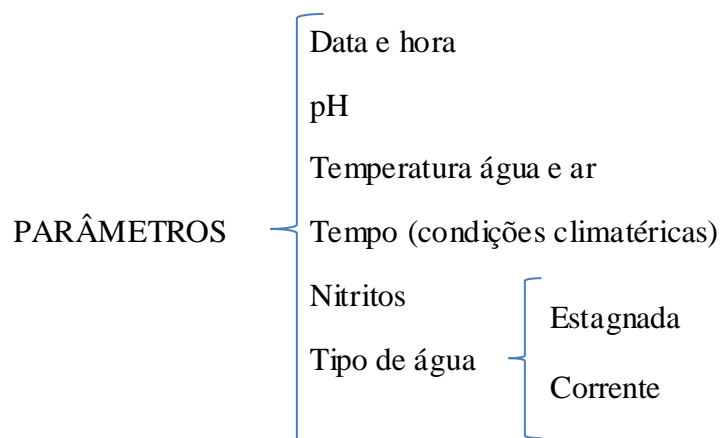
#### **2.2.1. Determinação (local) de parâmetros físicos-químicos das amostras**

Sabendo que as leptospiros sobrevivem em água fresca durante longos períodos de tempo, beneficiadas por características químico-físicas desse meio, como pH levemente alcalino (Trueba, 2004), decidiu-se durante o período de amostragem e nos locais de colheita, registar alguns parâmetros físicos e químicos, com a finalidade de, mais tarde, aquando do tratamento de resultados, perceber-se melhor a relação entre esses parâmetros e a presença ou não de leptospiros nas amostras de água recolhidas em cada um dos locais.

Os parâmetros (Figura 2.4.) registados no momento da colheita foram os seguintes: localização, incluindo data e hora; valor de pH; temperatura da água, temperatura do ar; condições atmosféricas; presença de nitritos e por último, um parâmetro da maior

importância, a tipologia da água, correspondendo este à classificação de água estagnada ou água corrente.

A temperatura da água e do ar foi medida com um termómetro digital marca *Mini RayTemp Thermometer* gentilmente cedido para o efeito pelo laboratório de Análises Clínicas Susana Pereira Rosas, Lda., localizado em Leiria.



**Figura 2.4.** Resumo esquemático dos parâmetros observados e registados durante a colheita das amostras de água.

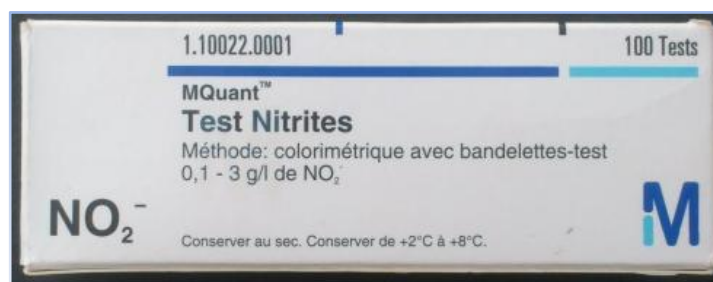
#### 2.2.1.1. Medição de pH e Nitritos

Tal como os outros parâmetros atrás referidos, a medição do pH foi realizada no momento da colheita de cada uma das amostras, tendo sido utilizadas para o efeito, tiras indicadoras do referido parâmetro marca *MColorphast*<sup>TM</sup> conforme se documenta na (Figura 2.5.).



**Figura 2.5.** Representação das tiras indicadoras de pH e respectivo padrão colorimétrico (*Fotografia original da autora*).

Por outro lado, para a determinação da presença/ausência de bactérias patogénicas Gram-negativas, capazes de reduzir nitratos a nitritos, que pudessem estar implicadas na transmissão de infeções, realizou-se a deteção de nitritos, também no momento da colheita e no local de amostragem, utilizando para isso tiras indicadoras do referido parâmetro, marca *MQuant*™ (Figura 2.6.).



**Figura 2.6.** Representação das tiras do teste para determinação e quantificação de nitritos (*Fotografia original da autora*)

### 2.3. Observação microscópica das amostras

Geralmente nos laboratórios de Leptospirose, Portugal incluído, as amostras mais utilizadas para a identificação microscópica de leptospiros são, na sua grande maioria,

amostras de fluidos orgânicos, tais como sangue, urina, soro e até líquido céfalo raquidiano (LCR) pelo que a experiência de observação para identificação das referidas espiroquetas, está muito rotinada nas referidas amostras, onde é menor a quantidade de contaminantes que podem dificultar a observação. Assim, por esta razão decidiu-se fazer também uma observação microscópica das amostras de água para detetar leptospiros (se presentes) e comparar estes resultados com os obtidos posteriormente com as técnicas moleculares.

Este procedimento - observação microscópica - foi dividido em duas etapas, pelo que se realizaram duas observações, utilizando um microscópio de fundo escuro (Figura 2.7.).



**Figura 2.7.** Microscópio de fundo escuro. *(Fotografia original da autora)*

A primeira observação foi feita a partir das amostras totais tal como obtidas no local de colheita, sem purificação; e a segunda, a partir do produto resultante da purificação (centrifugação-filtração).

#### **2.4. Purificação das amostras**

Após o transporte das amostras para o Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme da Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), da Universidade Nova de Lisboa, (UNL), onde decorreu o trabalho de bancada

conducente à realização da presente dissertação de Mestrado, todas as amostras foram sujeitas a diversos procedimentos prévios à realização das técnicas moleculares. Assim, as mesmas foram inicialmente submetidas a uma etapa de purificação. Este procedimento foi conseguido através de uma centrifugação e posterior filtração, com a finalidade de eliminar o máximo de contaminantes, melhorando assim a qualidade da amostra.

#### 2.4.1. Centrifugação

Como primeiro método de purificação e para se conseguir obter a sedimentação do máximo de contaminantes, as amostras foram submetidas a uma centrifugação curta a 2000 rpm durante cinco minutos, para a qual se utilizou uma microcentrífuga marca *Labonet* (Figura 2.8.). Para a realização deste procedimento, uma alíquota da amostra de aproximadamente um mililitro foi colocada em tubos *ependorf* de 1,5 ml. Do resultado da centrifugação recolheu-se o sobrenadante; considerando a natureza aeróbia das leptospiros e a sua viabilidade, estas migrariam para a superfície do centrifugado (sobrenadante).



**Figura 2.8.** Microcentrífuga “Spectrofuge 16M” marca *Labonet*.

(Fotografia original da autora)

### 2.4.2. Filtração

Após a centrifugação, o sobrenadante resultante da mesma foi sujeito a uma filtração, também com a finalidade de eliminar contaminantes, mas desta vez, os de menor tamanho e que não tivessem sido sedimentados com a prévia centrifugação.

A técnica de filtração utilizada foi semelhante à aplicada por Barragan e colaboradores em 2011, mas com algumas modificações; assim ao contrário dos referidos autores foram utilizados filtros Acrodisc<sup>®</sup> Syringe filter de 0,45 µm de diâmetro e seringas de 20 ml. Por último, o filtrado foi colocado em tubos *eppendorf*<sup>™</sup> de 1,5 ml como documentado na (Figura 2.9.).



**Figura 2.9.** Representação de material utilizado para realização da filtração das amostras de água. (Fotografia original da autora)

### 2.5. Extração de DNA das amostras

Imediatamente após o procedimento de purificação das amostras de água, iniciou-se a extração do DNA, isto, para evitar a degradação da mesma por fatores externos, pois desconhecia-se se as amostras continham DNA leptospírico e, em caso afirmativo, em que quantidade.

Para a extração foram ensaiados dois métodos: extração por fervura a 96°C e extração através de *kit* comercial.



### **2.5.1. Extração através de fervura a 96°C**

Este método tem a vantagem de ser mais simples de aplicar e ser menos suscetível de contaminação. Esta técnica utiliza unicamente a temperatura para conseguir a extração de DNA do interior da célula (bactéria), pelo que a amostra é submetida a 96°C durante um determinado período de tempo.

### **2.5.2. Extração através de *kit* comercial**

Como método de extração de DNA alternativo ao anterior, foi utilizado um *kit* comercial marca *Citogene*<sup>®</sup> *DNA Cell & Tissue Kit*, comercializado pela *Citomed*, de acordo com as instruções do fabricante, aplicando-se o protocolo de purificação de DNA idêntico ao usado para amostras biológicas (sangue, soro...). Apesar do protocolo não ser específico para amostras de água, o referido *kit* é, no entanto, usado com sucesso numa grande variedade de amostras de diversa natureza.

## **2.6 Amplificação de DNA de *Leptospira* spp.**

### **2.6.1. Testes de especificidade e sensibilidade dos *primers***

Antes de utilizar as sequências oligonucleotídicas (*primers*) indicadas para a amplificação de DNA leptospírico nas amostras de água, executaram-se testes de especificidade e de sensibilidade dos *primers* a utilizar. Assim, para os referidos testes foram usados *primers* universais para o género *Leptospira*, designados por (A e B) e específicos para algumas espécies de leptospiros patogénicas, designados por (G1 e G2) e (lipL32), estes últimos, obtidos da sequência do gene com o mesmo nome *lipL32*, este gene é comum a todas as espécies patogénicas de *Leptospira* (Jouglard *et al.*, 2006)

Para o teste de especificidade executaram-se algumas reações de PCR, utilizando para o efeito, quer os *primers* A e B (numa *nested* PCR), quer os *primers* lipL32 (*nested* PCR). O DNA molde (*template*) foi obtido após extração de culturas de serovares patogénicos (Copenhageni e Arborea) e saprófito (PatocI), respectivamente de *Leptospira interrogans* s.l. e de *L. biflexa* s.l., mantidos *in vitro* no laboratório, e ainda de

espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l.. O controlo negativo foi obtido de uma amostra de água autoclavada.

No que diz respeito ao teste de sensibilidade dos *primers*, começou-se por utilizar culturas de três serovares patogénicos (Copenhageni, Icterohaemorrhagiae e Ballum), com crescimento de sete a oito dias e cuja densidade ótica, se mediu num espectrofotómetro, sendo seleccionado o serovar de maior densidade ótica.

Preparam-se então diluições seriadas de  $10^8$  até  $10^1$  células/ml do serovar seleccionado.

Após a preparação das diluições foi feita a extracção e purificação do DNA, utilizando o *kit* comercial anteriormente referido, mas com um protocolo diferente do utilizado para a extração de DNA das amostras de água. Para as diluições do serovar seleccionado aplicou-se o protocolo indicado para purificação de DNA a partir de células, seguindo as indicações do fabricante. Os resultados das PCRs das referidas diluições de cultura de *Leptospira* permitiriam testar a sensibilidade da técnica.

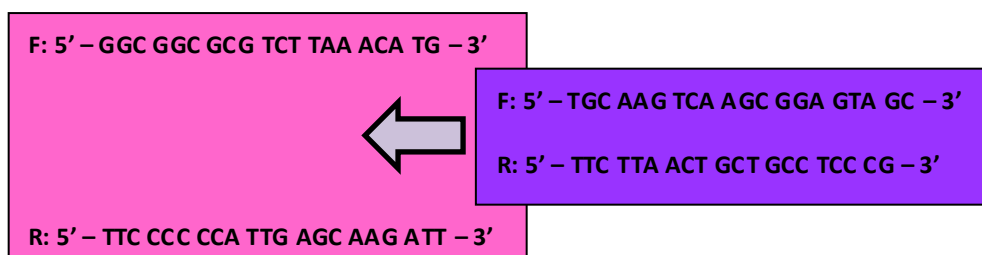
Os produtos amplificados a partir das diluições foram posteriormente analisados através de electroforese horizontal em gel de agarose (Bioline<sup>®</sup>) a 2%, durante 25 minutos a 135 volts. Como corante foi utilizado *GreenSafe Premium*<sup>™</sup> comercializado pela *Nzytech*. Esta solução é uma alternativa ao brometo de etídeo, com a vantagem de não ser tóxico, mutagénico e cancerígeno. Foi também usado um marcador de DNA o *HyperLadder* 100pb (100-1000pb) da Bioline<sup>®</sup>.

Após a electroforese, os geis foram observados sob luz ultravioleta (UV) no equipamento de imagem existente no laboratório, *Dolphin-DocGel Image System*, da *Wealtec*<sup>®</sup>.

De referir, que estes procedimentos foram igualmente seguidos quer na realização das reacções de PCR para amplificação de DNA nas amostras de água, na electroforese dos produtos amplificados e ainda na observação dos mesmos, razão pela qual já não se fará referência detalhada aos mesmos nos próximos itens.

## 2.6.2. Amplificação de DNA leptospírico com *primers* universais

Depois da extração do DNA das amostras de água, estas foram submetidas a um primeiro protocolo de *nested*-PCR com *primers* universais designados (A e B), obtidos do gene *rrs* (16S) e previamente descritos por (Merien *et al.*, 1992). Este protocolo inclui um segundo par de *primers*, com a função de amplificar uma outra região dentro da região já amplificada, processo que aumenta consideravelmente a sensibilidade do método (Figura 2.10.)



**Figura 2.10.** Representação dos dois conjuntos de *primers* universais (A e B) utilizados na reação de *nested*-PCR para amplificação de DNA de *Leptospira* spp., nas amostras de água, e previamente ensaiados no teste de especificidade.

Para a **1ª reação de PCR** preparou-se, em tubos de 0,2 mL, uma solução (*mix*) com um volume final de 25 µl, constituída por 2,5 µl do DNA da amostra ou *template*, 10X de buffer (Bioline®), 50mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline®), 100mM de DNTP's (Bioline®), 100 µM de cada *primer* (A e B), 5U/µl de *Taq polimerase* (Bioline®) e água ultrapura autoclavada para completar o volume final.

Posteriormente, para a **2ª reação de PCR**, a preparação da solução (*mix*) foi igual à da mistura para a 1ª PCR, com um volume final também de 25 µl, mas neste caso utilizaram-se 3 µl do DNA da amostra, obtido do produto da amplificação da 1ª reação, alterando-se o volume de água ultrapura autoclavada para obter o volume final de 25 µl.

O controlo positivo e negativo, foram obtidos respetivamente, de uma cultura de um serovar Ballum Arborea da bateria de referência de *L. interrogans* s.l., existente no laboratório, e de água ultrapura.

Para amplificação do DNA leptospírico, cada solução (*mix*) atrás descrita foi colocada num termociclador *MyCycler* marca *BioRad*<sup>®</sup> (Figura 2.11.), programado com as condições necessárias para cada uma das reações do referido protocolo de *nested*-PCR (Quadro 2.2.).

Os fragmentos de DNA que eram expectáveis obter após a *nested*-PCR são de 289 pb, em resultados da 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> amplificação, respetivamente.



**Figura 2.11.** Termociclador *MyCycler* (*BioRad*<sup>®</sup>) (Fotografia original da autora)

**Quadro 2.2.** Condições necessárias para amplificação de DNA leptospírico (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> reação) do protocolo *nested*-PCR com os *primers* universais A e B.

Número de ciclos	Fases da amplificação	Temp. (°C)	Duração
1 ciclo	Desnaturação inicial	94	3 min
30 ciclos	Desnaturação	94	1 min
	Emparelhamento	63	90 seg
	Extensão	72	1 min
1 ciclo	Extensão final	72	10 min

### 2.6.3. Amplificação de DNA leptospírico com *primers* específicos

Foi igualmente incluída no presente estudo a utilização de um protocolo de PCR (convencional) com *primers*, designados por (G1 e G2), previamente descritos por (Gravekamp *et al.*, 1993) com base no gene *secY*. Estes *primers* (Quadro 2.3.) amplificam uma parte do referido gene, que está localizado no operão S10-sps-a

codificante de proteínas ribossomais, e que está presente em espécies patogênicas de *Leptospira*, com exceção da espécie *L. kirschneri* (Hartskeerl, 2002). Este protocolo seria assim aplicado nas amostras cujo resultado fosse positivo pelo protocolo anteriormente referido (com *primers* universais).

**Quadro 2.3.** *Primers* G1-G2 utilizados para a amplificação de algumas espécies patogênicas de *Leptospira* (adaptado de Carreira, 2009).

Gene	Primer	Sequencia Nucleotídica (5'-3')	Fragmento (pb)	Manufatura
<i>secY</i>	G1	CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT	285	MWG
	G2	GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG		

A solução (*mix*) com um volume final de solução de 25 µl, foi constituída por 5µl extraído da DNA da amostra, 10X de *buffer* (Bioline®), 50mM de MgCl<sub>2</sub>, 100mM de dNTP's, 10 µM de cada *primer* (G1 e G2), 5U/µl de *Taq polimerase* e água ultrapura autoclavada para completar o volume final. Todos os reagentes utilizados na *mix* com exceção dos *primers*, foram da marca (Bioline®).

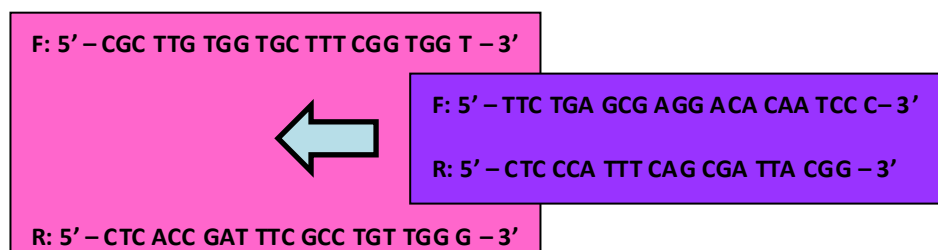
Para amplificação do material genético, as soluções foram colocadas num termociclador *MyCycler* marca BioRad®, programado com as condições necessárias (Quadro 2.4.).

**Quadro 2.4.** Resumo das condições para amplificação de DNA leptospírico através da utilização dos *primers* (G1-G2)

Número de ciclos	Fases da amplificação	Temp. (°C)	Duração
32 ciclos	Desnaturação	94	2 min
	Emparelhamento	63	2 min
	Extensão	72	3 min
	Extensão final	72	7 min

Por último, utilizou-se ainda um outro protocolo, *nested-PCR*, com *primers* designados por 'lipL32', obtidos da sequência do gene que codifica a proteína de superfície com o mesmo nome, comum a todas as espécies patogênicas de *Leptospira*. Este protocolo, tal como o de *nested-PCR* com os *primers* universais (A e B), contém um segundo par de *primers*, que amplifica uma outra região dentro da região já amplificada; aumentando assim a sensibilidade do método (Figura 2.12.).

Por esta razão este protocolo foi aplicado nas amostras com reações de PCR positivas (*primers* G1 e G2) e em algumas amostras positivas pela *nested*-PCR (*primers* A e B), sendo o presente protocolo utilizado para confirmação dos resultados obtidos nos anteriores.



**Figura 2.12.** *Primers* lipL32 utilizados na amplificação de DNA de leptospiras patogénicas.

Para a **1ª reação** desta *nested* PCR utilizou-se uma solução com um volume final de 25µl, constituída por 10 µl da amostra, 10x de *buffer*, 50 nM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de DNTP's, 100µM de cada *primer* (lipL32F – lipL32R), 5U/µL de *Taq polimerase* e água ultrapura autoclavada para completar o volume final. Tal como nas reações anteriores, todos os reagentes usados na *mix* com exceção dos *primers*, foram da marca (Bioline®).

Posteriormente para a **2ª reação** da *nested* PCR, a preparação da solução foi igual à 1ª PCR, com um volume final de 25 µl, mas neste caso utilizou-se apenas 1 µl de amostra, que corresponde ao produto da amplificação da 1ª PCR, alterando-se o volume de água ultrapura autoclavada para se obter os 25 µl de solução.

Para amplificação do material genético, as soluções foram colocadas num termociclador *MyCycler* marca BioRad®, programado com as condições necessárias abaixo descritas (Quadro 2.5.).

**Quadro 2.5.** Resumo das condições para a 1ª e 2ª amplificação de DNA leptospírico através da utilização dos *primers* lipL32.

Número de ciclos	Fases da amplificação	Temp. (°C)	Duração
32 ciclos	Desnaturação inicial	94	5 min
	Desnaturação	94	1 min
	Emparelhamento	55	1 min
	Extensão	72	1 min
	Extensão final	72	7 min

## 2.7. Sequenciação do DNA de *Leptospira* spp. das amostras

As amostras positivas pela *nested* PCR com os *primers* lipL32 e algumas igualmente positivas nos outros dois protocolos de PCR [*nested* PCR (A e B) e PCR (G1 e G2)], foram enviadas, para sequenciação, à empresa GaTC Biotech, localizada na Alemanha, com a finalidade de se identificar a(s) espécie(s) de *Leptospira* e serovares existentes nas amostras de água. Os resultados da sequenciação foram depois analisados por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) afim de se compararem as sequências de *Leptospira* spp obtidas com as existentes no GenBank®.

## 2.8. Análise e tratamento de dados

Foi construída uma base de dados no programa *Microsoft Excel 2010*, constituída pelos dados recolhidos no momento da recolha das amostras e durante o processamento das mesmas, a qual permitiu posteriormente cruzar e tratar os resultados obtidos e proceder à análise estatística.

Foi utilizado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), para comparar variáveis qualitativas, adotando-se o nível de significância de 0,05 ( $P < 0,05$ ).

### **3. RESULTADOS**



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Coleção e caracterização das amostras

Foi analisado um total de 100 amostras de água, obtidas em 15 locais descritos no ponto 2.1.1, localizados no Distrito de Leiria. O número de amostras colhidas por local dependeu da dimensão da respetiva coleção de água (Quadro 3.1.).

**Quadro 3.1.** Locais de amostragem e número de amostras colhidas em cada um deles.

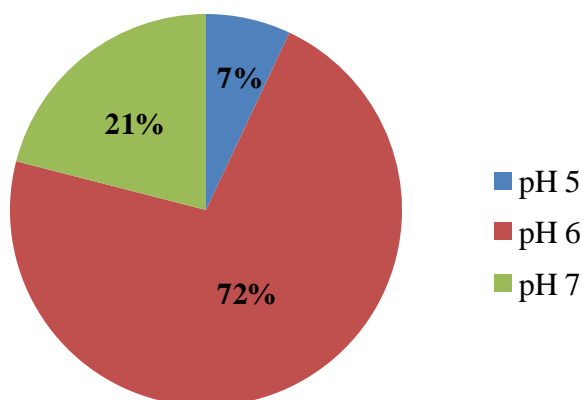
<b>Cod.</b>	<b>Local de amostragem</b>	<b>Nº de amostras</b>
A	Fonte das Três Bicas	5
B	Fonte de Jardim Luís de Camões	4
C	Fonte Luminosa	2
D	Rio Lis	13
E	Rio Lis (Cortes)	8
F	Ecoparque sensorial “Pia do Urso”	6
G	Mata de São Pedro de Moel	10
H	Lagoa de Óbidos	9
I	Antigo Lavadouro de Leiria	1
J	Fonte de Joaquim Ferreira	1
K	Fonte junto da Paróquia	1
L	Fonte do Jardim Santo Agostinho	2
M	Parque Municipal de Marinha Grande	11
N	Lagoa da Ervedeira	23
O	Lagoa de Vermoíl	4

##### 3.1.1. Valor de pH e quantificação de Nitritos

Como referido anteriormente (ponto 2.2.1.), a determinação destes e outros parâmetros físico-químicos foi realizada imediatamente após a colheita de cada amostra de água, para evitar possíveis alterações nos resultados.

No que respeita à temperatura registada esta variou entre os 15 e 25°C, de acordo com as condições atmosféricas verificadas aquando da realização da colheita das amostras.

O valor de pH das 100 amostras de água, situou-se muito próximo de 7, tendo-se verificado que 72% das amostras tinham um pH 6, e as restantes (21%) um pH compreendido entre 5 e 7 (Figura 3.1.).

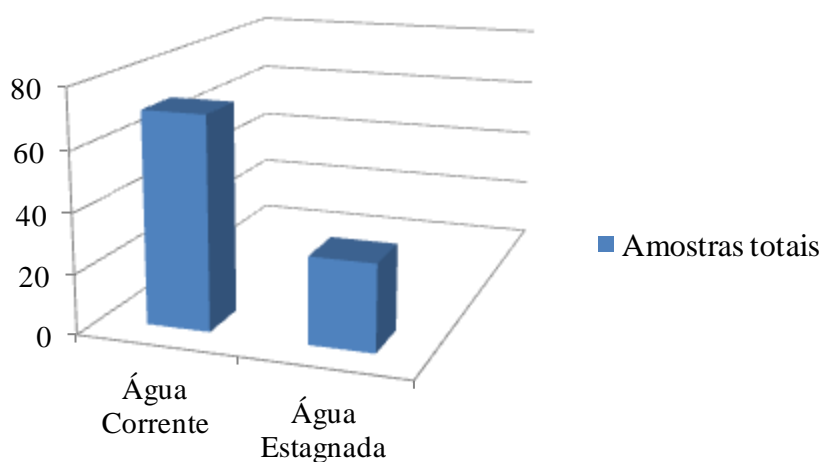


**Figura 3.1.** Representação gráfica da percentagem de amostras de água de acordo com a determinação dos valores de pH.

Quanto à quantificação de nitritos, o total das amostras revelou resultados inferiores a 0,1 mg/ml  $\text{NO}_2$ , que é o valor mínimo detetável pelo método utilizado (ponto 2.2.1.1.).

### 3.1.2. Tipologia da água

No que respeita ao tipo de água, do total das amostras obtidas, verificou-se que 71% das mesmas corresponderam a água corrente e as restantes (29%) a água considerada estagnada, como representado na Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Representação gráfica da percentagem de amostras de água corrente e estagnada.

### 3.2. Resultados da observação microscópica das amostras

Das 100 amostras colhidas, apenas 45 foram observadas microscopicamente, dada a extrema dificuldade para estabelecer a identificação morfológica das leptospiros face à existência dos inúmeros contaminantes presentes nas amostras.

Das amostras observadas só quatro (8,9%) revelaram a presença de formas morfológicamente semelhantes a leptospiros (Quadro 3.2.).

**Quadro 3.2.** Amostras de água com resultados microscópicos

Amostra	Observação microscópica
A1	Positiva
B3	Positiva
D1	Positiva
G4	Positiva

### 3.3. Dados da purificação das amostras

#### 3.3.1. Após centrifugação e filtração

Tal como foi referido em ‘Material e Métodos’ nos pontos 2.4.1 e 2.4.2, a realização do processo de purificação das amostras, foi efetuada por centrifugação seguida de filtração. Para esta última, foram utilizados filtros *Acrodisc® Seringe filter* de 0,45µm de diâmetro, mas só nas 20 primeiras amostras; devido aos resultados obtidos optou-se por utilizar apenas a centrifugação para a purificação de todas as amostras.

### 3.4. DNA extraído das amostras de água

A Figura 3.3., documenta os resultados obtidos pelos dois métodos de extração de DNA (fervura a 96°C e *kit* comercial), a partir de diluições seriadas de uma estirpe de *Leptospira interrogans* s.l. O DNA extraído foi submetido a uma *nested-PCR*, utilizando *primers* universais (A e B).

Paralelamente, foi feita também a extração do DNA da mesma cultura de *Leptospira*, utilizando o *kit* comercial, tendo o DNA extraído sido submetido ao mesmo protocolo de *nested*-PCR.



**Figura 3.3.** Representação de resultados obtidos pela técnica de *nested*-PCR (*primers* A e B), para amplificação de DNA extraído duma estirpe de *Leptospira interrogans* s.l. através de *kit* comercial e por “fervura” a 96°C.

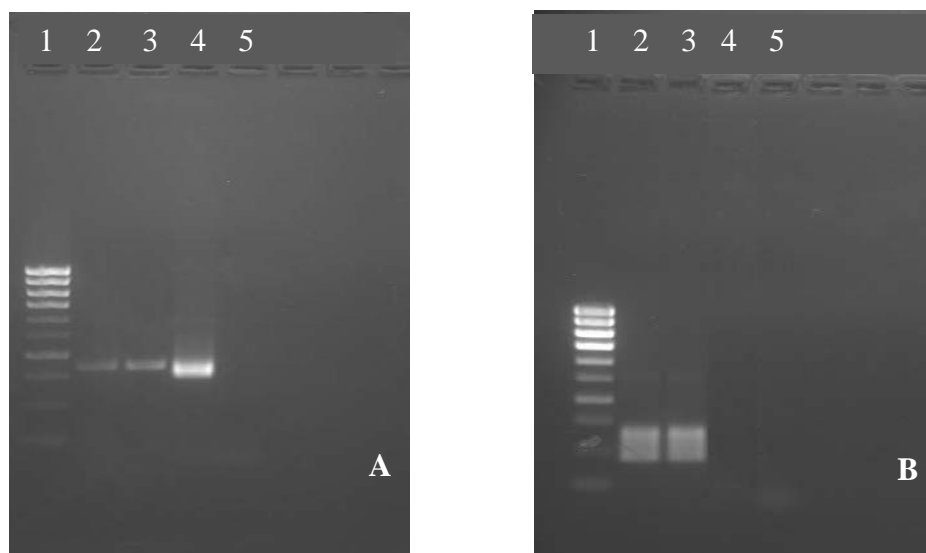
Considerando os resultados obtidos (Figura 3.5.) optou-se pelo método do *kit* comercial, para fazer as extrações de DNA das amostras em estudo. Outra das razões porque se optou pelo *kit* comercial, foi o facto de se desconhecer qual a quantidade de DNA leptospírico presente nas amostras, e se este fosse reduzido, as amostras sujeitas a uma temperatura elevada (96°C) levaria à degradação de DNA, e poder-se-iam obter resultados falsos negativos.

### 3.5. DNA amplificado de *Leptospira* spp

#### 3.5.1. Determinação da especificidade e sensibilidade de *primers* universais e específicos

Foram realizados testes de especificidade para os protocolos A e B e lipL32, tendo-se verificado que os *primers* lipL32 são específicos para *L. interrogans* s.l., já que não se observou amplificação de DNA na estirpe representante da espécie *L. biflexa*, bem

como na amostra de borrelíias. Em contrapartida os *primers* A e B amplificaram todas as leptospiiras (patogénicas e saprófitas), não se tendo verificado amplificação da estirpe de *Borrelia burgdorferi* s.l. (Figura 3.4.).



**Figura 3.4.** Fotos de géis que representam a especificidade dos protocolos de PCR utilizados. **A**-Especificidade (*primers* A e B) **B**. Especificidade (*primers* lipL32):1- Marcador de 100-1000pb; 2- *L. interrogans* (Icterohaemorrhagie, Copenhageni); 3- *L. interrogans* (Ballum, Arborea); 4- *L. biflexa* (Patoc I); 5- *Borrelia burgdorferi* s.l.

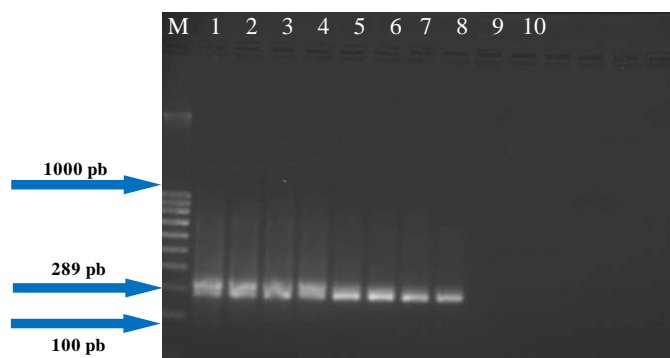
Em relação ao teste de sensibilidade dos *primers*, a cultura escolhida foi de leptospiiras do serogrupo/serovar (Ballum/Arborea), por ter sido a que apresentou a maior densidade óptica, com um valor de  $1,63 \times 10^8$  bact/ml.

As diluições seriadas deste serovar foram submetidas às reações de PCR com os *primers* universais (A e B) e *primers* específicos (G1-G2 e lipL32), tendo-se obtido diferentes valores de sensibilidade (Quadro 3.3.).

**Quadro 3.3.** Valores da sensibilidade dos diferentes protocolos de PCR.

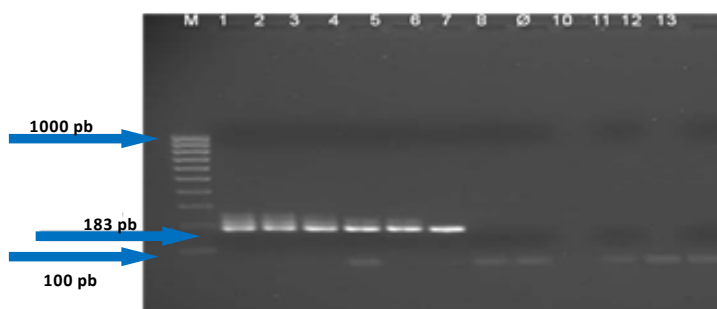
<i>Primers</i>	Sensibilidade (células/ml)
A e B	$10^1$
G1-G2	$10^4$
lipL32	$10^2$

O protocolo que apresentou maior sensibilidade foi o de *nested*-PCR com *primers* A e B, que conseguiu amplificar o DNA até à concentração de  $10^1$ , valor correspondente a 10 células por mililitro (10 cel/ml) (Figura 3.5.)



**Figura 3.5.** Foto do gel que representa a sensibilidade da técnica *nested*-PCR para amplificação de DNA leptospírico, (*primers* A e B): 1 a 9 ( $10^8$  a  $10^0$  cel/ml), 10 (controles negativos) e M (marcador molecular 100-1000pb).

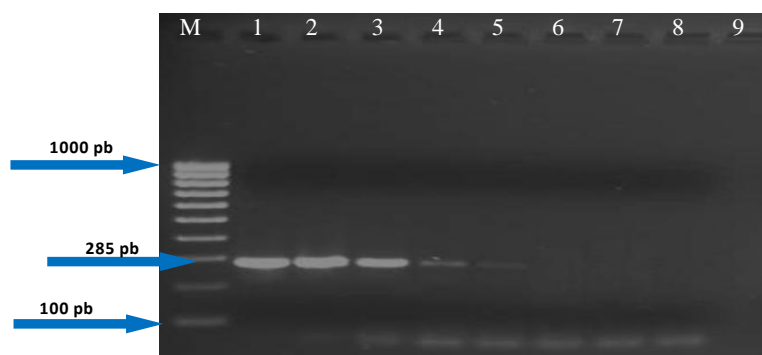
Em relação à *nested*-PCR com *primers* específicos lipL32, observou-se uma sensibilidade de  $10^2$ , isto é, conseguindo amplificar DNA leptospírico até à concentração de 100 células por mililitro (100 cel/ml) (Figura 3.6.).



**Figura 3.6.** Foto do gel que representa a sensibilidade da técnica *nested*-PCR para amplificação de DNA leptospírico, (*primers* lipL32): 1 a 9 - ( $10^8$  a 1 cel/ml); 11 e 12 (controles negativos); 13 - Controlo negativo *L. biflexa* (Patoc I); M (marcador molecular)

Por último, o protocolo que apresentou menor sensibilidade, foi o da PCR com *primers* parcialmente específicos (G1-G2), o qual conseguiu amplificar DNA leptospírico

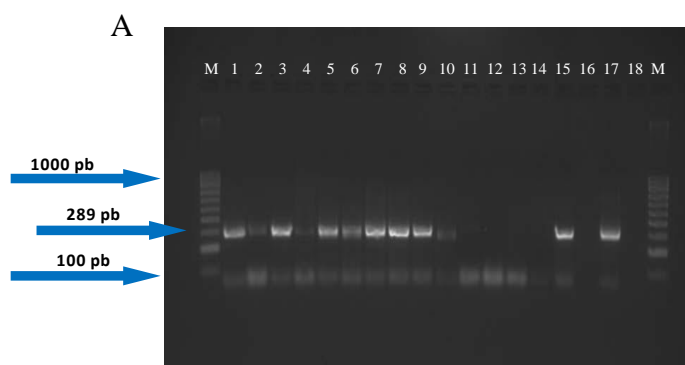
apenas a diluição igual ou superior a  $10^4$  células por mililitro (Figura 3.7.), apesar de na diluição correspondente a  $10^3$  ainda se evidenciar amplificação, mas já muito ténue.



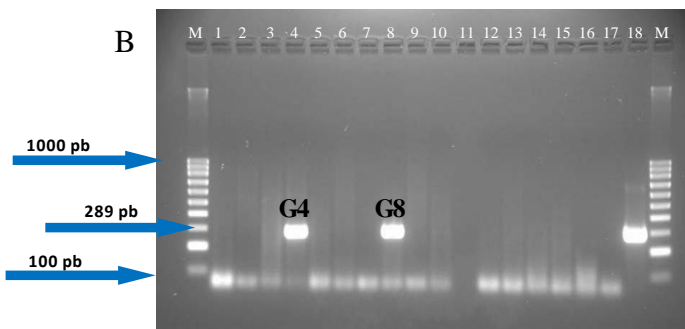
**Figura 3.7.** Foto do gel que representa a sensibilidade da técnica de PCR para amplificação de DNA leptospírico, com os *primers* específicos (G1-G2) 1 a 8 - ( $10^7$  a 1 cel/ml); 9 (controlo negativo).

### 3.5.2. DNA leptospírico nas amostras, usando *primers* universais

Das 100 amostras analisadas e que foram submetidas primeiramente a uma *nested*-PCR com *primers* universais (A e B), em 41 das mesmas foi amplificado DNA de *Lepstospira* spp. (Figura 3.8. A e B)



**Figura 3.8. A.** Foto do gel que documenta o resultado de amplificação de DNA de *L. interrogans* s.l., com os *primers* A e B; 1 a 15 – amostras de água; 16 – Controlo negativo; 17 – Controlo positivo; M – Marcado molecular (100pb).



**Figura 3.8. B.** Foto do gel que documenta o resultado da amplificação de DNA de *L. interrogans* s.l., com *primers* A e B; 1 a 10 – amostras de água; 12 a 17 – Controlos negativos; 18 – Controlo positivo; M – Marcador molecular (100pb); G4 e G8 – Amostras Positivas - Mata São Pedro de Moel.

Como se pode constatar neste último exemplo (Figura 4.B), registou-se uma positividade expressiva das amostras G4 e G8, indicativa da amplificação de DNA de *Leptospira* spp.

Do total das amostras positivas para *Leptospira* spp., uma grande percentagem das mesmas (73,2%) apresentaram um pH 6 e as restantes amostras (26,8%) um pH entre 5 e 7.

Por outro lado, das quatro (4) amostras observadas microscopicamente, em que se logrou identificar formas sugestivas de leptospiros, em apenas três detetou-se DNA, utilizando a *nested*-PCR com *primers* (A e B) (Quadro 3.4).

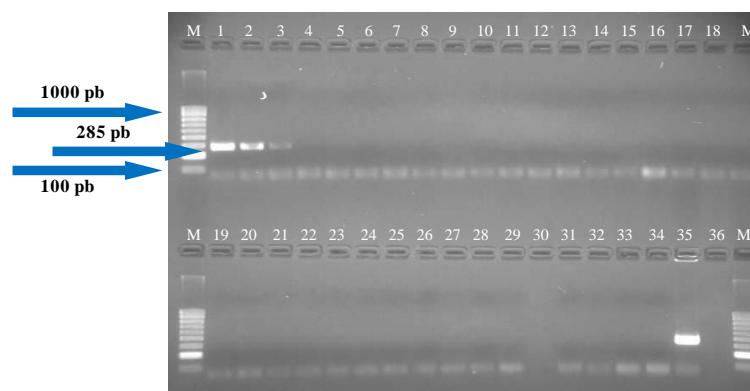
**Quadro 3.4.** Amostras de água com resultados microscópicos positivos e os resultados obtidos na *nested*-PCR (A e B)

Amostra	Observação microscópica	Análise molecular
A1	Positiva	Positiva
B3	Positiva	Positiva
D1	Positiva	Negativa
G4	Positiva	Positiva

### 3.5.3. DNA leptospírico nas amostras, usando *primers* específicos (G1-G2 e lipL32)

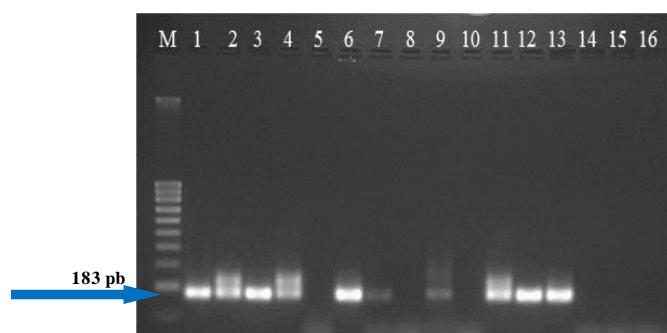
As amostras com resultado positivo para *Leptospira* spp. foram submetidas posteriormente a dois protocolos de PCR com *primers* específicos para leptospiros patogénicas. O primeiro protocolo aplicado foi a PCR com os *primers* G1-G2, e destas 41 amostras apenas sete (7) correspondendo a (17,07%) foram positivas para leptospiros patogénicas (Figura 3.9.).





**Figura 3.9.**Foto do gel que represente resultados de amplificação de DNA leptospirico com *primers* G1-G2 (285pb); 1 a 29 – Amostras de água; 31 a 34 - Controlos negativos; 35 - Controlo positivo; M – Marcador molecular (100pb).

As mesmas amostras (n=41) foram submetidas a um segundo protocolo de *nested*-PCR para leptospiros patogénicas com os *primers* (lipL32) (Figura 3.10.)



**Figura 3.10.** Foto do gel representado o resultado de amplificação de DNA leptospirico com *primers* lipL32 (183 pb): 1 a 13 – Amostras de águas; 14 a 18 – Controlos negativos; 19 – Controlo positivo (Ballum, Arborea); M – Marcador molecular (100pb).

Os resultados obtidos aumentaram significativamente, detetando-se DNA em 28 (68,3%) das referidas amostras. O quadro da página seguinte resume os resultados com os três protocolos de PCR utilizados.

**Quadro 3.5.** Resultados obtidos nos diferentes protocolos de PCR aplicados nas amostras de água.

Pontos de amostragem	Cod.	<i>Nested</i> -PCR A e B	PCR G1-G2	<i>Nested</i> -PCR lipL32
Fonte das três bicas	A1	+	-	-
Fonte do Jardim Luís de Camões	B3	+	-	+
Fonte luminosa	C1	+	-	-
“	C2	+	-	-
Rio Lis	D2	+	-	+
“	D3	+	-	+
“	D4	+	+	+
“	D6	+	-	-
“	D7	+	-	+
“	D9	+	-	-
“	D11	+	-	+
“	D12	+	-	+
“	D13	+	-	+
Ecoparque sensorial Pia do Urso	F4	+	-	+
“	F5	+	-	+
Mata de São Pedro de Moel	G4	+	+	+
“	G8	+	+	+
Lagoa de Óbidos	H1	+	-	-
“	H3	+	+	+
“	H5	+	+	+
“	H7	+	-	-
“	H9	+	+	+
Antigo lavadouro de Leiria	I1	+	-	-
Parque Municipal Marinha Grande	M6	+	+	+
“	M8	+	-	+
“	M10	+	-	+
Lagoa da Ervedeira	N1	+	-	+
“	N2	+	-	+
“	N3	+	-	-
“	N4	+	-	+
“	N5	+	-	+
“	N7	+	-	-
“	N8	+	-	+
“	N9	+	-	-
“	N10	+	-	+
“	N12	+	-	+
“	N13	+	-	+
“	N19	+	-	-
“	N20	+	-	+
Lagoa Vermoil	O1	+	-	+
“	O2	+	-	-

### 3.6. Sequenciação de DNA de *Leptospira* spp. das amostras

Das 41 amostras com resultado positivo (DNA de *Leptospira* spp.), 26 foram sequenciadas, para o que se utilizaram os produtos dos diferentes protocolos de PCR,

principalmente os da *nested*-PCR lipL32, tendo-se sequenciado 22 produtos (amostras) obtidos pelo referido protocolo. Algumas amostras foram submetidas a uma purificação antes do processo de sequenciação, para garantir um melhor resultado.

As amostras sequenciadas quase na sua totalidade mostraram percentagens elevadas de similaridade (97 a 99%) quando comparadas com as sequências da espécie genética *Leptospira interrogans* sensu stricto (s.s.) depositadas no GeneBank (Quadro 3.6.)

**Quadro 3.6.** Resultados da sequenciação das amostras

Amostras	Pontos de amostragens	Resultado da sequenciação (genoespécie)	Similaridade
B3*	Fonte do jardim Luís de Camões	<i>Leptospira interrogans</i>	98%
D4	Rio Lis	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
D2*	“	<i>Leptospira interrogans</i>	98%
D11	“	<i>Leptospira interrogans</i>	96%
D12*	“	<i>Leptospira interrogans</i>	98%
F4*	Ecoparque “Pia do Urso”	<i>Leptospira interrogans</i>	98%
F5	“	<i>Leptospira interrogans</i>	98%
G8*	Mata de São Pedro de Moel	<i>Leptospira interrogans</i>	100%
H3	Lagoa de Óbidos	<i>Leptospira interrogans</i>	96%
H5	“	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
H9	“	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	96%
M6*	Parque municipal Marinha Grande	<i>Leptospira interrogans</i>	92%
M8	“	<i>Leptospira interrogans</i>	97%
M10*	“	<i>Leptospira interrogans</i>	97%
N1	Lagoa da Ervedeira	<i>Leptospira interrogans</i>	98%
N2	“	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
N8	“	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
N9	“	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
N10	“	<i>Leptospira interrogans</i>	98%
N20*	“	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
O1*	Lagoa de Vermoil	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
O2	“	<i>Leptospira biflexa</i> serovar Patoc	98%

(\*) Amostras submetidas a um processo de purificação antes de serem sequenciadas

Os produtos de PCR (amostras) que foram purificados antes da sequenciação (marcados com um asterisco no quadro anterior), correspondem ao total de produtos amplificados pela *nested*-PCR lipL32.

### 3.7. Tratamento estatístico

Fez-se o teste Qui-quadrado para determinar a associação entre os diferentes valores de pH registados e a presença ou ausência de *Leptospiras* spp., e *Leptospira interrogans* nas amostras em estudo, tendo os resultados obtidos revelado não existir associação

estatisticamente significativa para as referidas variáveis, tendo se obtido o valor de  $p=0,993$  para *Leptospira* spp., e  $p=0,743$  para *L. interrogans* s.l., sabendo que para haver associação entre as variáveis qualitativas em apreço, o valor de  $p$  deveria ser menor que 0,05 para um grau de confiança de 95% (*vidé* ponto 2.8.).

Da mesma maneira aplicou-se o mesmo teste para a associação entre o “Tipo de água” (estagnada ou corrente) e a presença ou ausência de *Leptospira* spp., nas amostras. O resultado obtido foi  $p=0,106$ , indicando também ausência de associação entre as referidas variáveis. Devido ao número de amostras, relativamente reduzido em alguns locais de colheita aplicou-se o teste de Fisher para determinar a existência de associação entre o tipo de água e a presença ou ausência de *L. interrogans* s.l. nas amostras recolhidas, tendo-se obtido um resultado de  $p=0,014$ , que evidencia a existência de associação estatisticamente significativa entre a água e a presença de leptospiros.

## **4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Ontem como hoje, a Leptospirose continua a ser considerada uma zoonose de distribuição mundial, afetando principalmente regiões com deficiente qualidade sanitária, localizadas geralmente em países sub-desenvolvidos e/ou em desenvolvimento. No entanto, a existência desta doença não se limita só a estas variáveis, dado que a infeção pode ocorrer em qualquer área geográfica, sempre que exista um meio apto para o desenvolvimento e preservação das leptospiros e ocorram condições o contacto destas com os humanos e/ou outras espécies animais.

Por outro lado, e devido à diversidade dos sintomas clínicos que caracterizam a doença e por esta ser algumas vezes confundida a nível clínico, continua a ser sub-diagnosticada, o que representa um problema, porque devido às diferentes formas de manifestação da leptospirose e por ser uma doença infecciosa, pode evoluir rapidamente provocando complicações multiorgânicas, que são muitas vezes fatais.

Sabendo-se que é uma doença cujo diagnóstico laboratorial não é simples nem rápido, a abordagem molecular constitui já uma mais valia porque permite realizar um diagnóstico precoce e assim implementar de imediato um tratamento, porém, isto só é válido nos primeiros dias da infeção, isto é, antes que sejam produzidos e detetados os primeiros anticorpos contra as leptospiros.

Em Portugal, os estudos sobre a Leptospirose, tem sido realizados principalmente a partir de amostras biológicas humanas ou animais, nunca se tendo estudado a presença destas espiroquetas em águas superficiais o que é de vital importância, devido ao papel que estas desempenham como veículo para a transmissão das referidas bactérias, e consequente infeção de humanos e outras espécies animais.

Assim, o presente estudo, foi pioneiro em Portugal, razão pela qual não existindo nenhum tipo de antecedentes no país a este nível, o desenvolvimento desta investigação foi realizado partindo de referências e de metodologias utilizadas por investigadores de diferentes países (Trueba *et al.*, 2002, 2004; Narita *et al.*, 2005; Ismail *et al.*, 2014), que igualmente estudaram coleções de água doce no que respeita à presença de *Leptospira* spp.

Foi assim realizado no país, um estudo piloto, com base num total de 100 amostras de água doce provenientes de diferentes locais do Distrito de Leiria. Esta amostragem considerada de conveniência, não deixa de ser representativa e análoga à utilizada em outros estudos cuja dimensão amostral foi da mesma ordem de grandeza (Vital-Brazil, 2010). O referido estudo utilizou exatamente 100 amostras e outros estudos foram mesmo realizados com um número inferior de amostras (Calderón *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2014).

A sobrevivência das bactérias do género *Leptospira* spp., no ambiente é condicionada por fatores físico-químicos, tais como o valor de pH, a temperatura, a tipologia da água, entre outros. Assim, nas amostras estudadas, verificou-se que o valor de pH das mesmas se situou entre 5 e 7, tendo a maior parte das amostras (72%) mostrado um valor de pH 6. Comparativamente ao que se conhece sobre a natural exigência das leptospiros para sobreviverem em águas de superfície, cujo pH ideal é neutro a levemente alcalino, os nossos resultados mostraram para este parâmetro, um valor ligeiramente abaixo, o qual porém, está de acordo com estudos realizados por outros autores (Kairani-Bejo *et al.*, 2004; Trueba *et al.*, 2004) que indicam, de modo análogo, valores de pH da mesma ordem de grandeza. Registou-se que 30 das 41 amostras positivas para *Leptospira* spp. e 19 das 28 amostras positivas para *L. interrogans* apresentaram um pH 6 no momento da colheita, no entanto, após a realização do teste Qui-quadrado para estimar a existência de associação entre o valor de pH e a presença de *Leptospiras* spp. e *L. interrogans* s.s., nas amostras de água estudadas, o resultado obtido não mostrou existir uma associação entre as referidas variáveis, o que nos faz pensar que em futuras investigações seria muito importante aumentar o número total de amostras a estudar (superior a 100), para avaliar melhor a existência, ou não, da referida associação.

No que diz respeito à purificação das amostras por filtração, os resultados obtidos nas 20 primeiras amostras, demonstraram que devido à presença de contaminantes existentes nas mesmas, os filtros de 0,2 µm, tal como descrito por (Barragan *et al.*, 2011), não foram os mais eficazes, pelo que se optou por utilizar filtros de 0,45 µm, tendo então sido obtida 100% de eficácia na filtração das referidas amostras. Estes resultados vão ao encontro de um estudo realizado em 2010, por Kaboosi e colaboradores, que igualmente obtiveram total sucesso nas mesmas condições de filtração. Foi no entanto, ensaiado

ainda outro método de purificação (centrifugação) nas referidas 20 amostras. Após comparação dos resultados com os obtidos anteriormente, verificou-se uma total concordância entre os dois métodos, pelo que se optou por este último (centrifugação), para a totalidade das amostras de água em estudo.

Para a extração de DNA das amostras, foram igualmente utilizados dois métodos; um por “fervura”, isto é, extração a 96°C e outro, utilizando um *kit* comercial. Este processo é de vital importância para a posterior execução das técnicas moleculares, pelo que durante a extração de DNA o ideal é conseguir a menor degradação possível do mesmo. Após a execução de um e de outro método, ficou demonstrado que a extração de DNA por “fervura” a 96°C não é a mais indicada em amostras de água por diversas razões: *i*) apenas se obteve DNA de uma amostra; *ii*) desconhecer-se totalmente a quantidade de DNA alvo, no caso, DNA de *Leptospira* spp., que as amostras poderiam conter; e *iii*) não existir nenhum estudo prévio em Portugal, sobre a presença de leptospiras nas águas sob avaliação. Todas estas limitações, poderiam concorrer para a existência de resultados falsos negativos, já que apesar da simplicidade da sua execução, a degradação de DNA na amostra é muito elevada. Assim, a extração de DNA pelo *kit* comercial apesar de não ser teoricamente indicada para amostras de água e de exigir uma execução mais minuciosa e sempre suscetível de contaminação, permitiu-nos obter resultados satisfatórios.

Quanto à deteção de DNA de *Leptospira* spp., foram utilizados diversos protocolos de PCR, utilizando diferentes *primers*, para amplificação do respetivo DNA, quer para o género *Leptospira*, por recurso a sequências oligonucleotídicas (*primers*) universais, os *primers* (G1 e G2) e ainda os designados por lipL32, para amplificação respetivamente de DNA de algumas, e da totalidade das espécies patogénicas de *Leptospira*. Tal como Benacer e colaboradores em 2013, a utilização do protocolo de *nested*-PCR com *primers* (A e B) permitiu-nos detetar a presença de bactérias do género *Leptospira*, isto é, patogénicas e saprófitas, nas amostras de água, sendo que em 41% das mesmas foi amplificado DNA das referidas espiroquetas, tendo-se registado uma exuberante presença do mesmo, quando comparada a intensidade dos amplicões obtidos face aos resultados previamente documentados na avaliação da sensibilidade com base em



diluições seriadas de serovares/estirpes representantes de bactérias do gênero *Leptospira*.

Foram avaliados dois protocolos de PCR para identificação de *L. interrogans*, um deles a PCR com os *primers* (G1-G2) também utilizado por Benacer *et al*, 2013. Nas 41 amostras positivas para *Leptospira* spp., sete foram positivas para *L. interrogans*. Estas mesmas 41 amostras foram igualmente sujeitas a *nested*-PCR com os *primers* (lipL32), também utilizados por outros autores (Calderón *et al*, 2014) para todas as espécies patogênicas de *Leptospira*, tendo-se obtido resultados completamente diferentes em relação ao protocolo com os *primers* (G1-G2), onde das 41 amostras, 28 foram positivas para *L. interrogans* s.s., desta maneira confirma-se o ótimo nível de sensibilidade dos *primers* lipL32 em relação à menor sensibilidade do protocolo com (G1-G2), o que indica que este último protocolo, com base no gene *secY* que amplificam uma parte do referido gene, localizado no operão S10-sps-a codificante de proteínas ribossomais, por estar presente apenas em algumas espécies patogênicas de *Leptospira* e não em todas, não teve o sucesso obtido com o protocolo de *nested*-PCR lipL32. No entanto, comprovou-se a especificidade da PCR (G1-G2) para algumas leptospirosas patogênicas, pois todos os fragmentos de DNA amplificados corresponderam a amostras também positivas na *nested*-PCR lipL32.

Não deixa de ser relevante confrontar os dados moleculares obtidos e os parâmetros físicos e químicos das respectivas amostras. Assim, importa referir que 30 das 41 amostras com presença de *Leptospira* spp. (73,1%) e 19 das 28 amostras positivas para *L. interrogans* s.s. (67,9%) tinham um pH 6 no momento da colheita. Estes dados estão também em concordância com estudos anteriores (Vital-Brazil, 2010; Benacer *et al*, 2013), que verificaram também valores de pH semelhantes nas amostras de água contaminada com as referidas espiroquetas. Porém, após a realização do teste Qui-quadrado para avaliar a associação entre o pH e a presença de *Leptospiras* spp., e de *L. interrogans* s.s., nas amostras de água, o resultado indicou ausência da referida associação, para os dois grupos de amostras, o que nos faz pensar que em futuras investigações seria muito útil aumentar o número de amostras totais do estudo (sempre superior a 100), para avaliar melhor a existência ou não de associação entre estas variáveis. Outro aspeto importante foi a relação estabelecida entre a tipologia da água

(corrente e estagnada), sendo que os resultados mostraram que as leptospirosas estiveram maioritariamente presentes na água corrente, tendo existido uma associação com significado estatístico para a referida variável.

Por último, depois da sequenciação dos produtos de PCR de algumas amostras, o resultado foi de algum modo preocupante, já que quase na sua totalidade, as amostras estudadas mostraram uma elevada similaridade com a espécie *Leptospira interrogans* s.s., que é uma espécie conhecida como uma das mais patogénicas para os humanos. Sabendo que existem muitas pessoas em contacto com estas águas e que *L. interrogans* s.s., está presente nas mesmas, poder-se-á ficar na dúvida sobre a qualidade do diagnóstico clínico feito para a Leptospirose e por consequência para o défice de casos reportados, pois de acordo com as Autoridades de Saúde Pública de Leiria, no referido distrito, desde 2011 até março de 2015 só foram reportados dois casos de Leptospirose, o que evidencia o sub-diagnóstico e a respetiva sub-notificação de que esta doença se reveste em muitos países, incluindo Portugal.

Assim, e em termos de conclusão pode dizer-se que:

- Em futuras investigações na mesma área, seria muito importante aumentar o número de amostras a estudar e assim, realizar uma expansão geográfica, não só no distrito agora estudado como noutras regiões de Portugal;
- O protocolo de *nested*-PCR com os *primers* lipL32 é muito eficaz para a identificação de leptospirosas patogénicas;
- Este protocolo não só é útil para amostras biológicas humanas ou animais, mas ficou demonstrado a sua capacidade de deteção de DNA de leptospirosas patogénicas em amostras de águas obtidas no ambiente;
- A utilização de técnicas moleculares permitiu obter resultados rápidos e fidedignos, e permitiu obter, pela primeira vez no país, uma informação sobre a presença de *Leptospira* spp., em locais de grande exposição para a população humana e outras populações animais, que apesar de limitada a um único distrito, não deixa de

contribuir e alertar para o que certamente existe nos restantes distritos, sobretudo os que têm um enquadramento mais rural.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Adler, B., R. J. Chappel and S. Faine.** 1982. The sensitivity of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zentbl Bakteriol.* **252**: 405-413.

**Adler, B., and M. M. Pereira.** 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology.* **140**:287-296.

**Barragan, V.A., M. E. Mejia, A. Trávez, S. Zapata, R. A. Hartskeerl, D. A. Haake and G. A. Trueba.** 2011. Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from the surface water. *Curr Microbiol.* **62**:1802 – 1806.

**Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Matthias, M. M. Diaz, M. A. Lovett, M. A. Levett, R. H. Gilman, M. R. Willig, E. Gotuzzo and J. M. Vinetz.** 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect.* **3**:757-771.

**Calderon, A., V. Rodríguez, S. Máttar and G. Arrieta.** 2014. Leptospirosis in pigs, rodents, humans, and water in an área of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod.* **46**:427-432.

**Cardona, E. M., R. M. Moros, E. A. López, J. L. Pérez and R. C. Hernández.** 2008. Diagnóstico de Leptospirosis mediante la PCR en pacientes com síndrome febril icterohemorrágico. *Rev Soc Venez Microbiol.* **28**:24-30.

**Carreira, T. M.** 2009. Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce da leptospirose humana. Dissertação de Mestrado de Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

**Collares-Pereira, M.** 1991. Bovine leptospirosis in cattle in Portugal: bacteriological and serological findings. *The Vet Rec.* **128**: 549-550.

**Collares-Pereira, M.** 1992. Contribuição para o estudo do Género *Leptospira* em Portugal. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

**Collares-Pereira, M.** 1994. *Leptospira* e Leptospiroses – Epidemiologia e diagnóstico laboratorial. *Cadernos de doenças Infeciosas.* **3**:23-28.

**Collares-Pereira, M. and M. L. Vieira** 2001. Fatal leptospirosis, Azores islands. *Weekly Epidemiologic Rec.* **15**: 109-111.

**Collares-Pereira, M., H. Korver, B. V. Cao-Thi, M. Santos-Reis, E. Bellenger, G. Baranton and W. J. Terpstra.** 2000. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiol Let.* **85**: 181-187.

**Crespo, J.** 1990. Leptospirose: Importância do serogrupo “Pomona” na região do Centro do país: Revisão da casuística do Serviço de Medicina III, Hospital da Universidade de Coimbra. J Med. **129**:148-152.

**Daher, E. D. F., K. L. S. D. Abreu and G. B. D. Silva Junior.** 2010. Insuficiência renal aguda associada à leptospirose. J Bras Nefrol **32**: 408-415.

**Dutta, T. K. and M. Christopher.** 2005. Leptospirosis – An overview Japi. **53**: 545-551.

**Evangelista, K. V. and J. Coburn.** 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiol. **5**:1413-1425.

**Faine, S., B. Adler, Bolin and P. Perolat.** 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2<sup>a</sup> ed, MediSci Melbourn. Australia.

**Ferreira, W. C., J. C. Sousa and N. Lima.** 2010. Microbiologia. Coordinating ed., Lidel – edições técnicas, Lda., Lisboa.

**Gomes, M. J. P.** 2013. Fontes Citação na escrita científica: Gênero *Leptospira* spp. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Leptospira%204-2013-1.pdf>

**Gomez, G. R.** 2008. Enfermedades de los Bovinos, p. 168-173. Enciclopédia Bovina, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (ed). México.

**Gonçalves, A. T., C. Paiva, F. Melo-Mota, M. L. Vieira, T. Carreira, M. Nunes, L. Mota-Vieira, A. Ahmed, R. A. Harstkeerl, K. Hyde and M. Collares-Pereira.** 2010. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. Int J Infect Dis. **14**:48-53.

**Gonçalves, A. T.** 2009. Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* spp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

**Hartskeerl, R. A., M. Collares-Pereira and W. A. Ellis.** 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clin Microbiol Infect. **17**:494-501.

**Jouglaard, S. D., S. Simionatto, F. K. Seixas, F. L. Nassi and O. A. Dellagostin.** 2006. Nested reação em cadeia da polimerase para a detecção de leptospirosas patogênicas Can J Microbiol. **52** (8): 7 47-52.

**Kaboosi, H., M. R. Razavi and A. A. Noohi.** 2010. Efficiency of filtration technique for isolation of leptospire from surface waters: Role of different membranes with different size and materials. *African Journal of Microbiology Research*. **4**: 671-676.

**Ko, A. I., M. G. Reis, C. R. Dourado, W. Johnson and L. Riley.** 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *The Lancet*. **354**: 820-825.

**Kobayashi, Y.** 2001. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother*. **7**: 10-15.

**Lins, Z. C., M. L. Lopes and O. M. Maroja.** 1986. Epidemiologia das leptospiroses com particular referência à Amazônia brasileira, p. 733-764. Fundação Serviços de Saúde Pública. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém.

**Levett, P. N.** 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. **14**: 296-326

**Levett, P. N., S. L. Branch, C. U. Whittington, C. N. Edwards and H. Paxton.** 2001. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis of Acute Leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. **8**:349-351.

**Meites, E., M. T. Jay, S. Deresinski, W. Shieh, S. R. Zaki, L. Tompkins and D. S. Smith.** 2004. Reemerging Leptospirosis California. *Emer Infect Dis*. **10**: 406-412.

**Narita, M., S. Fujitani, D. A. Haake and D. L. Paterson.** 2005. Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama Islands, Japan. *Am J Trop Med. Hyg*. **73**: 652-656.

**Perret, C. P., K. V. Abarca, J. P. Dabanch, V. G. Solari, P. C. García, S. L. Carrasco, R. C. Olivares and P. Avalos.** 2005. Risk factors and frequency of positive antibodies for leptospirosis in a sub urban population near Santiago. *Rev Méd Chile*. **133**: 426-431.

**Picardeau, M., D. M. Bulach, C. Bouchier, R. L. Zuerner, N. Zidane, P. J. Wilson, S. Creno, E. S. Kuczek, S. Bommezzadri, J. C. Davis, A. McGrath, M. J. Johnson, C. Boursaux-Eude, T. Seemann, Z. Rouy, R. L. Coppel, J. I. Rood, A. Lajus, J. K. Davies, C. Médigue and B. Adler.** 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLOS ONE*. **3**-1607.

**Reis, R. B., G. S. Ribeiro, R. D. M. Felzemburgh, F. S. Santana, S. Mohr, A. X. T. O. Melendez, A. Queiroz, A. C. Santos, R. R. Ravines, W. S. Tassinari, M. S. Carvalho, M. G. Reis and A. I. Ko.** 2008 Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLOS Negl Trop Dis*. **2**:228.

**Salwani, I., W. A. Noor, B. Norhidayah, R. A. Nor, C. C. Yeo and L. Z. Ahmad.** 2014. A Study on the Presence of Pathogenic *Leptospira* spp. In environmental water samples obtained from select recreational areas in Terengganu, Malaysia. *Res J Pharm and Tech.* **7**: 1153-1157.

**Stoddard R. A., D. Bui, D. L. Haberling, V. Wuthiekanun, J. Thaipadungpanit, A. R. Hoffmaster.** 2014. Viability of *Leptospira* isolates from a human outbreak in Thailand in various water types, pH and temperature conditions. *Am J Trop Med Hyg.* **91**: 1020-1022.

**Suarez, H. M., R. M. Sanches, P. E. P. Fernandez, I. G. Vidal, F. Bravo and A. S. Sibello.** 1999. Brotes de leptospirosis humana en la provincia de Ciego de Avila, Cuba. *Rev Soc Bras Med Trop.* **32**:13-18.

**Slack, A. T., M. L. Symonds, M. F. Dohnt and L. D. Smythe.** 2006. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004. *Epidemiol and Infect.* **11**: 1-9.

**Trueba, G., S. Zapata, K. Madrid and N. Penafiel.** 2002. Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) al agua dulce. *Rev Cubana Med Trop.* **54**: 11-4.

**Trueba, G., S. Zapata, K. Madrid, P. Cullen and D. Haake.** 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol.* **7**: 35-40.

**Vanasco, N. B., G. Sequeira, M. L. Dalla Fontana, S. Fusco, M. D. Sequeira and D. Enría.** 2000. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo –abril 1998. *Rev Panam Salud Publica.* **7**: 35-40.

**Vieira, M. L.** 2006. Aspectos da caracterização antigénica e molecular da Leptospirose em áreas endémicas. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 300pp.

**Vieira, M. L., J. M. Gama-Simões and M. Collares-Pereira.** 2006. Human Leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis.* **10**: 378-386.

**Vijayachari, P., A. P. Sugunan and A. N. Shriram A. N.** 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* **33**: 557-569.

**Vital-Brazil, J. M., I. T. Balassiano, F. S. D. Oliveira, A. D. D. S. Costa, L. Hillen and M. M. Pereira.** 2010. Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **10**: 353-355.



**Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, I. G. Saint, D. A. Haake, P. J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D. M. Underhill, C. J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P. S. Tobias and R. J. Ulevitch.** 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol.* **2**: 346–52.

**WHO/ILS. (World Health Organization/International Leptospirosis Society).** 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control, 109 pp.

**Zunino, E. and R. Pizarro.** 2007. Leptospirosis. Puesta al día. *Rev Chil Infectol.* **24**: 220-226

## **6. ANEXOS**

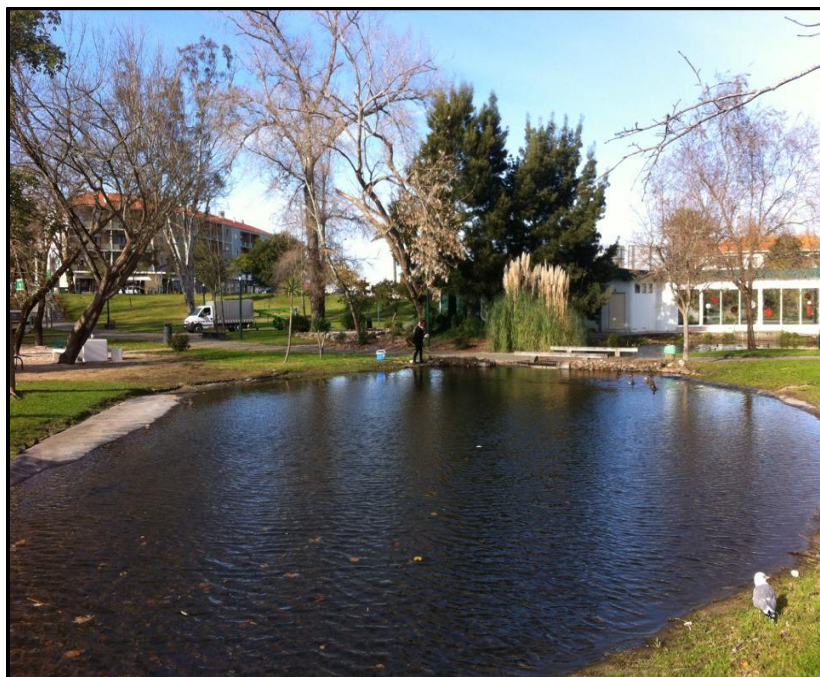
## 6. ANEXOS

**Anexo 1 Documentações fotográficas da recolha de amostras de água, nos diferentes locais seleccionados** (*Fotos originais da autora*)

### Lagoa de Óbidos



## Parque Municipal de Marinha Grande

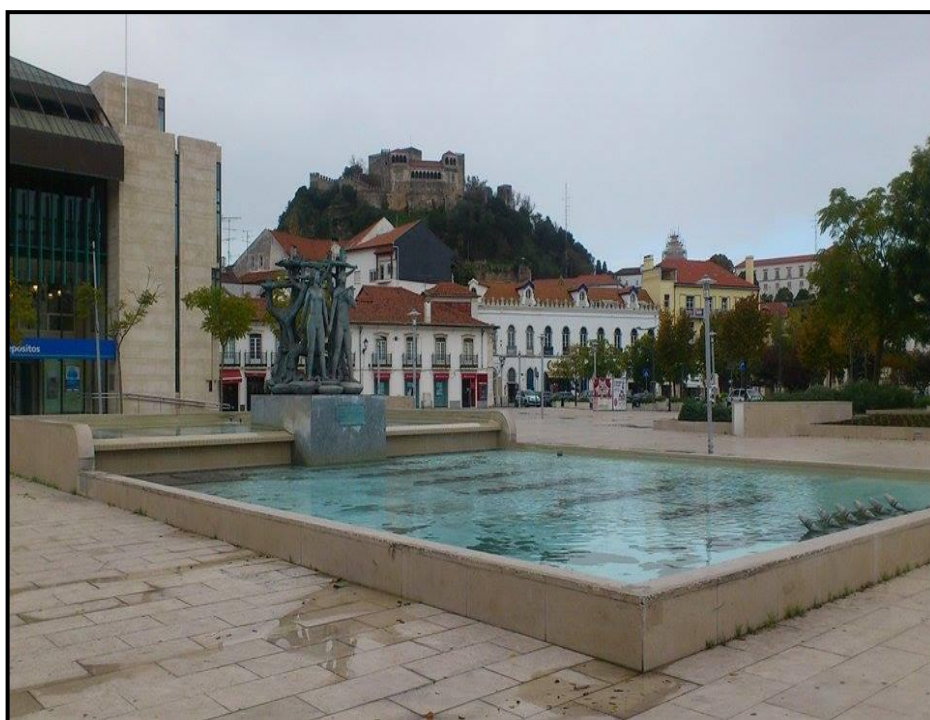




### Mata de São Pedro



### Fonte Luminosa de Leiria



### Fonte das Três Bicas



### Rio Lis

